

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-325181

(43)Date of publication of application : 18.11.2003

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
C12M 1/00
C12Q 1/00
C12Q 1/04
C12Q 1/34
C12Q 1/68
G01N 33/53
G01N 33/566
G01N 33/569
// (C12Q 1/04
C12R 1:385)

(21)Application number : 2002-134940

(22)Date of filing : 10.05.2002

(71)Applicant : FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES LTD

(72)Inventor : MATSUHISA AKIO

EDA SOJI

ABE KANAKO

SUGIMOTO NORIHIKO

KAWAGUCHI NAOKO

KARASHI AYA

IWAMI TAKANAO

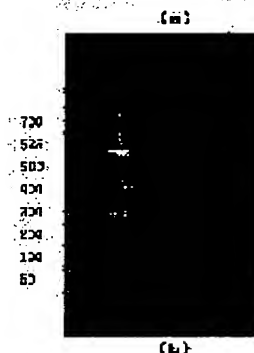
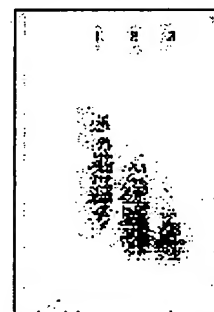
UEHARA KEIJI

(54) PROBE FOR DETECTING PSEUDOMONAS AERUGINOSA AND METHOD USING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a means for specifically and rapidly detecting the existence of *Pseudomonas aeruginosa* taken in a specimen.

SOLUTION: The probe for detection comprises a fragment of a DNA that *Pseudomonas aeruginosa* has, especially a fragment having 350-600 average base length and exhibits specific cross-reactivity to the DNA that *Pseudomonas aeruginosa* has. The method for detecting *Pseudomonas aeruginosa* using the probe for detection and the assay kit are also provided.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-325181

(P2003-325181A)

(43) 公開日 平成15年11月18日 (2003. 11. 18)

(51) Int.Cl.⁷

C 1 2 N 15/09

識別記号

Z N A

F I

C 1 2 M 1/00

C 1 2 Q 1/00

1/04

1/34

1/68

データベース (参考)

A 4 B 0 2 4

C 4 B 0 2 9

4 B 0 6 3

A

C 1 2 M 1/00

C 1 2 Q 1/00

1/04

審査請求 未請求 請求項の数18 O L (全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願2002-134940 (P2002-134940)

(22) 出願日

平成14年5月10日 (2002. 5. 10)

(71) 出願人 000238201

扶桑薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号

(72) 発明者 松久 明生

大阪府大阪市城東区森之宮2-7-506

(72) 発明者 江田 宗司

京都府京都市山科区御陵封じ山町7-147

(72) 発明者 安部 加奈子

大阪府枚方市村野本町30-39

(74) 代理人 100065868

弁理士 角田 嘉宏 (外2名)

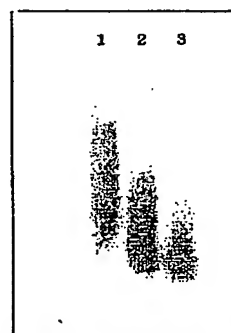
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シュードモナス・アエルギノーザ菌の検出用プローブおよびそれを用いた方法

(57) 【要約】 (修正有)

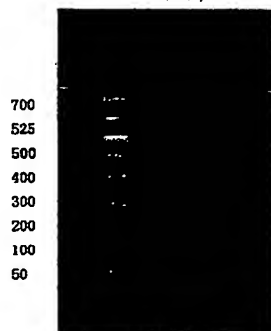
【課題】 検体内に取り込まれたシュードモナス・アエルギノーザ菌の存在を特異的かつ迅速に検出する手段を提供する。

【解決手段】 シュードモナス・アエルギノーザ菌が保有するDNAの切断片、特に、平均塩基長が350~600の切断片を含み、かつ同菌が保有するDNAに対して特異的な交差反応性を示す検出用プローブの提供、および該検出用プローブを用いたシュードモナス・アエルギノーザ菌検出方法、ならびに測定キットを提供する。



DNAse 量
1. 20mU
2. 40mU
3. 60mU

(a)



(b)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 シュードモナス・アエルギノーザ (*Pseudomonas aeruginosa*) 菌の検出用プローブであって、当該プローブが、シュードモナス・アエルギノーザ菌が保有するDNAに対して特異的な交差反応性を示し、かつ以下の塩基配列、すなわち、

- (a) 配列番号：3乃至6のいずれかに記載の塩基配列；
- (b) 塩基配列(a)と70%以上の相同性を有する塩基配列；または、
- (c) 塩基配列(a)および／または(b)に対して相補的な塩基配列、を含む、

ことを特徴とするシュードモナス・アエルギノーザ菌の検出用プローブ。

【請求項2】 前記塩基配列が、平均塩基長が350～600の核酸断片である請求項1に記載の検出用プローブ。

【請求項3】 前記DNAが、染色体DNAである請求項1または2に記載の検出用プローブ。

【請求項4】 請求項1乃至3のいずれかに記載の検出用プローブを用いることを特徴とするシュードモナス・アエルギノーザ菌の検出方法。

【請求項5】 前記検出方法が、以下の工程、すなわち；

- (a) 臨床検体より取得した生体由来の食細胞を支持担体上に固定し、
 - (b) 固定した食細胞の細胞膜の透過性を亢進する化学処理を行い、
 - (c) 食細胞に含まれる感染症原因菌の染色体DNAを得、
 - (d) ストリンジェントな条件下で、当該DNAと請求項1乃至3のいずれかに記載の検出用プローブとのin situハイブリダイゼーションを行い、および
 - (e) ハイブリダイゼーションシグナルを検出する、
- 工程を含む請求項4に記載の検出方法。

【請求項6】 前記臨床検体が、血液、組織液、リンパ液、脳脊髄液、膿、粘液、鼻水、痰、尿、腹水、透析排液、組織洗浄液、皮膚、肺、腎、粘膜、およびこれらの組み合わせからなるグループから選択される請求項5に記載の検出方法。

【請求項7】 請求項1乃至3のいずれかに記載の検出用プローブを用いることを特徴とするシュードモナス・アエルギノーザ菌の同定方法。

【請求項8】 前記同定方法が、以下の工程、すなわち；

- (a) 臨床検体より取得した生体由来の食細胞を支持担体上に固定し、
- (b) 固定した食細胞の細胞膜の透過性を亢進する化学処理を行い、
- (c) 食細胞に含まれる感染症原因菌の染色体DNAを得、

(d) 当該DNAをアルカリ変性および中和処理し、および

(e) ストリンジェントな条件下で、当該DNAと請求項1乃至3のいずれかに記載の検出用プローブとのドットプロットハイブリダイゼーションを行う、

工程を含む請求項7に記載の同定方法。

【請求項9】 前記臨床検体が、血液、組織液、リンパ液、脳脊髄液、膿、粘液、鼻水、痰、尿、腹水、透析排液、組織洗浄液、皮膚、肺、腎、粘膜、およびこれらの組み合わせからなるグループから選択される請求項8に記載の同定方法。

【請求項10】 感染症原因菌の検出方法であって、以下の工程、すなわち；

- (a) 感染症原因菌の染色体DNAを得、
 - (b) 請求項1乃至3のいずれかに記載の検出用プローブを構成する塩基配列の少なくとも一部からなるプライマーを調製し、
 - (c) 当該DNAと当該プライマーとの共存系にてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行い、および
 - (d) 増幅されたDNAを検出する、
- 工程を含む、ことを特徴とする感染症原因菌の検出方法。

【請求項11】 前記感染症原因菌が、シュードモナス・アエルギノーザ菌である請求項10に記載の検出方法。

【請求項12】 食細胞に食食された外来微生物の遺伝子を観察する方法であって、以下の工程、すなわち；

- (a) 臨床検体より取得した生体由来の食細胞を支持体上に固定し、
 - (b) 固定した食細胞の細胞膜の透過性を亢進する化学処理を行い、
 - (c) 食細胞に含まれる感染症原因菌の染色体DNAを得、
 - (d) ストリンジェントな条件下で、当該DNAと請求項1乃至3のいずれかに記載の検出用プローブとのin situハイブリダイゼーションを行い、
 - (e) ハイブリダイゼーションシグナルを検出し、
 - (f) 工程(a)～(e)を繰り返して実施し、および
 - (g) ハイブリダイゼーションシグナルの経時的変化をモニターする、
- 工程を含む、ことを特徴とする食細胞に食食された外来微生物の遺伝子を観察する方法。

【請求項13】 請求項1乃至3のいずれかに記載の検出用プローブおよびDNA露出処理剤を含む、ことを特徴とするシュードモナス・アエルギノーザ菌の検出キット。

【請求項14】 前記DNA露出処理剤が、リゾスタフィン、リゾチーム、N-アセチルムラミダーゼ、ザイモラーゼおよびこれらの組み合わせからなるグループから選択される酵素を含む請求項13に記載の検出キット。

【請求項15】 前記検出用プローブが、界面活性剤と

共存している請求項13または14に記載の検出キット。

【請求項16】 前記検出キットが、血液分離試薬、酵素前処理試薬、酵素試薬、アセチル化試薬、ブロッキング試薬、標識抗体、標識抗体希釈液、発色前処理液、発色試薬、対比染色液、PBS原液、ハイブリダイゼーション原液、標識抗体洗浄液、発色試薬洗浄液、プローブ希釈液、バッファAおよびこれらの組み合わせからなるグループから選択される試薬をさらに含む請求項13乃至16のいずれかに記載の検出キット。

【請求項17】 前記検出キットが、APSコートスライドガラス、低速遠心機、恒温機、血球計算盤、振とう機、湿潤箱、恒温槽、光学顕微鏡、可変式ピペット、採血管、チップ、ピペット、染色ビン、メスシリンダー、注射筒、シリジトッップフィルターおよびこれらの組み合わせからなるグループから選択される器具をさらに含む請求項13乃至16のいずれかに記載の検出キット。

【請求項18】 チップ基板および当該基板の表面にその一端が固定されてなるDNA断片を有するDNAチップであって、当該断片が請求項1乃至3のいずれかに記載の検出用プローブまたはその断片である、ことを特徴とするDNAチップ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、一般的には、シュードモナス・アエルギノーザ (*Pseudomonas aeruginosa*) 菌の検出技術の改良に関し、詳細には、シュードモナス・アエルギノーザ菌の検出のための新規のプローブ、これらプローブを利用したシュードモナス・アエルギノーザ菌の検出方法、およびこれら方法の関連技術に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】シュードモナス・アエルギノーザ菌とは、「緑膿菌」とも称される細菌であり、主に、自然界の水系、土壌、動植物の生体内などに生息するグラム陰性桿菌である。

【0003】シュードモナス・アエルギノーザ菌は、一般的には、健常者に対しては病原性を示さないが、熱傷を原因とする菌血症や、カテーテル留置患者における尿路感染症、それに、人工呼吸器を装着した患者など、局所的感染防御能または全身的感染防御能が低下している患者に対してその病原性をよく発揮する。また、この細菌は、院内感染肺炎の原因菌であるとともに、日和見感染症の代表的な起因菌である。

【0004】また、シュードモナス・アエルギノーザ菌は、臨床的には、敗血症や心内膜炎といった全身性感染症や、肺炎、脳髄膜炎、慢性膀胱炎などの局所感染症の起因菌でもある。特に、悪性腫瘍、白血病、膠原病などでの原疾患およびそれらに対する治療のために生体の感染防御機構が低下している状態の患者が、この細菌に感染すると、敗血症へ進展する。この状態がさらに進

行すると、ショックや、汎発性血管内凝固症候群(DIC)、成人呼吸促進症候群(ARDS)などを合併し、多臓器障害となり、死に至る場合がよくある。特に、シュードモナス・アエルギノーザ菌を原因とする敗血症にあっては、実に、53.6%もの患者が除菌されずに死亡するに至っている。そして、この細菌による感染症の場合、起因菌が判明する以前の経験的治療が無効である場合も多く、初期治療の失敗が、予後不良の原因であるともされている。

【0005】シュードモナス・アエルギノーザ菌の同定にあつては、通常、ヒツジやウマなどの脱線維血液を5%添加した血液寒天平板培地に検体を直接塗抹してこれを培養し、次いで、培地上に発育したコロニー周囲の溶血環の性状を観察する手法が採られている。しかしながら、実際のところ、起因菌の確定は容易に実施しえないのが通常である。これはすなわち、コロニーの形状は培養条件により大きく異なり、その菌種の特が困難な場合が多いことによる。また、菌の培養に長時間を有する上に、薬剤感受性成績の結果を得るまでには、さらに3~4日の培養が必要であることも、迅速な診断を難しくしている。加えて、感染症を疑われた時点で大量に抗生物質を投与されている場合には、たとえ検体に菌が含まれていても、細菌の増菌・増殖が抑えられている場合があり、実際のところ、これらの検体から菌を培養できる可能性は極めて低いものとなっている。

【0006】一方、感染症における食細胞の機能に着目した方法として、血液試料中の白血球成分が集中してなるバフィーコート(Buffy coat)の塗抹染色標本作製して、これを検鏡する方法がある。一般に、バフィーコート標本で菌が検出される頻度は、成人菌血症では耳朶血の頻度と同様に30%程度にとどまるが、新生児の場合、10例中7例(70%)で菌を検出している報告もある。このように、塗抹標本を検鏡することによって得られる末梢血での菌の有無に関する情報は、治療における大きな指針となっている。

【0007】しかしながら、この方法によると、標本作製の前処理操作として、少なくとも検体からの菌の選択的分離に1~2日、増菌に1日、固定操作に1日以上、合計で3~4日の時間を要している。現実には、菌が発育するまで培養を続けることになるので、前処理操作に一週間以上要する場合が多く、さらに、菌の培養時に疾患の原因菌以外の菌が混入しても区別できない場合もある。そして、重要なことに、このような事情から、培養すべき検体中の多くの菌は食細胞に取り込まれて、投与された抗生物質の作用で死滅または静止の状態にあるため、培養条件下でも増殖できる菌の数は少なく、臨床検体を用いた培養による実際の菌の検出率は10%前後と非常に低い数値になる。換言すれば、臨床的にシュードモナス・アエルギノーザ菌による感染症の可能性が疑われた患者の血液を、さらに一昼夜以上培養して検査

しても、結局のところ、その90%は菌の存在すら判明していないのが現状である。

【0008】それ故、起因菌の確定と、それに即した抗生物質の選択が要求されているにもかかわらず、臨床的にシュードモナス・アエルギノーザ菌による感染症の可能性が疑われた段階で、検出結果が出るのを待たずに治療に踏み込んでいるのが、大方の臨床現場での実情である。すなわち、起因菌不明のまま、最も広範囲な種類の菌に対して有効な抗生物質を投与し、1～2日間様子を見て、効果が現れないと別の抗生物質に切換えるという試行錯誤的な方法に頼っているのである。

【0009】その他に、免疫学的側面に着目した方法として、(i)ラテックス凝集法、(ii)共同凝集法、(iii)酵素免疫測定法、(iv)金粒子測定法、(v)リボソーム免疫測定法などの手法を用いて、シュードモナス・アエルギノーザ菌を検出する迅速診断法が開発されている。しかし、これら免疫学的検査法は、測定結果が培養法による結果と一致せず、偽陽性や偽陰性を示す場合がよくあることや、手技が煩雑であるなどの問題点が残されている。

【0010】このように、シュードモナス・アエルギノーザ菌が関与する感染症にあつては、迅速・確実な診断が求められているにもかかわらず、従来の診断方法では、十分対応できていなかったのが実情である。

【0011】このような諸問題を解決するために、本出願人は、貪食細胞に貪食された外来微生物の検出および／または同定のための方法を発明した(特公平7-40号)。すなわち、この方法によれば、貪食細胞中に存在する外来微生物由来の遺伝子は、これら遺伝子に対して特異的にハイブリダイゼーション可能なプローブを用いたin situハイブリダイゼーションによって検出される。具体的には、この方法は、生体由来の臨床検体より取得した食細胞を固定し、これら食細胞に対して細胞膜の透過性を亢進させるための処理を施し、食細胞内に取り込まれた感染症原因菌のDNAを露出し、ストリンジェントな条件下で感染症原因菌のDNAにハイブリダイゼーション可能な検出用DNAプローブを用いたin situハイブリダイゼーションを行い、および、ハイブリダイゼーションシグナルの出現の有無によって感染症原因菌を検出および／または同定する、との一連の工程を含む。

【0012】敗血症が疑われた患者の血液を、この方法に従って検査したところ、血液培養法と比較して約4倍の感度で菌を検出し、さらに24時間以内に判定を終えることができたことから、この方法は感染症分野において脚光を浴びている。

【0013】また、本出願人は、シュードモナス・アエルギノーザ菌が保有するDNAと特異的に反応するプローブも発明している(特許第2965544号)。それらプローブは、シュードモナス・アエルギノーザ菌の存在を的確に検出し、なおかつ検出精度も高い。そのため、患

者に投与する抗生物質を選択する上での、貴重な判断材料を提供する可能性が注目されている。

【0014】このように、本願発明は、シュードモナス・アエルギノーザ菌の検出感度および／またはシュードモナス・アエルギノーザ菌に対する特異性がさらに改善された新規プローブ、特に、ハイブリダイゼーション用プローブの提供に加え、これらプローブを利用することで、従前の検出方法よりも検出効率ならびに検出感度に優れた検出方法や検出手段の実現をも、その目的としている。

【0015】

【課題を解決するための手投】本発明は、従来技術で認識されていた上掲の不都合に鑑みて発明されたものであって、その要旨とするところは、シュードモナス・アエルギノーザ菌に対して特異的な交差反応を示し、かつ
(a) 配列番号：3乃至6のいずれかに記載の塩基配列；
(b) 塩基配列(a)と70%以上の相同性を有する塩基配列；または、(c) 塩基配列(a)および／または(b)に対して相補的な塩基配列を含む、シュードモナス・アエルギノーザ菌の検出用プローブにある。

【0016】また、本発明によれば、前述した検出用プローブを用いたシュードモナス・アエルギノーザ菌の検出方法も提供される。この検出方法は、(a) 臨床検体より取得した生体由来の食細胞を支持体上に固定し、
(b) 固定した食細胞の細胞膜の透過性を亢進する化学処理を行い、
(c) 食細胞に含まれる感染症原因菌の染色体DNAを得、
(d) ストリンジェントな条件下で、得られた染色体DNAと本発明の検出用プローブとの間でin situハイブリダイゼーションを行い、および(e) ハイブリダイゼーションシグナルを検出する工程を含む。

【0017】さらに、本発明の他の態様によれば、感染症原因菌の検出方法が提供される。

【0018】この検出方法は、(1) 感染症原因菌の染色体DNAを得、(2) 本発明の検出用プローブを構成する塩基配列の少なくとも一部からなるプライマーを調製し、(3) 得られた染色体DNAと当該プライマーとの共存系にてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行い、および(4) 増幅されたDNAを検出する工程を含む。

【0019】そして、本発明のさらに他の態様によれば、食細胞に貪食された外来微生物の遺伝子を観察する方法が提供される。この観察方法は、(i) 臨床検体より取得した生体由来の食細胞を支持体上に固定し、(ii) 固定した食細胞の細胞膜の透過性を亢進する化学処理を行い、(iii) 食細胞に含まれる感染症原因菌の染色体DNAを得、(iv) ストリンジェントな条件下で、得られた染色体DNAと本発明の検出用プローブとのin situハイブリダイゼーションを行い、(v) ハイブリダイゼーションシグナルを検出し、(vi) 工程(i)～(v)を繰り返して実施し、および(vii) ハイブリダイゼーションシグナルの経時的変化をモニターする工程を含む。

【0020】加えて、本発明のさらに他の態様によれば、本発明の検出用プローブ、食細胞含有検体調製器具、支持担体、細胞膜用化学処理剤、DNA露出処理剤、ハイブリダイゼーション用具およびハイブリダイゼーションシグナル検出器具を含むシェードモナス・アエルギノーザ菌の検出キットが提供される。

【0021】そして、本発明のさらに別の態様によれば、チップ基板および当該基板の表面にその一端が固定されてなる本発明の検出用プローブまたはその断片とを具備したDNAチップが提供される。

【0022】

【発明の実施の形態】以下に、本願発明を詳細に説明する。

【0023】定義

まず、本明細書で使用する「臨床検体」の語は、生体由来の食細胞が含まれる臨床検体を総称するものであり、例えば、血液、組織液、リンパ液、脳脊髄液、膿、粘液、鼻水、痰などの体液が挙げられる。また、糖尿病、腎障害、肝障害などの病態によっては、尿、腹水、透析排液などの他に、鼻腔、気管支、皮膚、各種臓器、骨などを洗浄した後の洗浄液にも生体由来の食細胞が含まれるため、これらも臨床検体の範疇に包含される。

加えて、皮膚、肺、腎、粘膜などの組織も本発明の臨床検体として用いることができる。これはすなわち、食細胞の一つであるマクロファージには、単球、肺泡マクロファージ、腹腔マクロファージ、固定マクロファージ、遊離マクロファージ、ハンゼマンマクロファージ、炎症性マクロファージ、肝クッパー細胞、脳ミクログリア細胞などの様々な形態に変化するため、血液のみならず、これらを含む組織までもが本発明の臨床検体として用いることができることによる。例えば、腎炎が疑われる患者から、腎生検に従って腎組織を採取し、トリプシン等の酵素を用いることによって細胞を剥離してこの組織内に存在する食細胞を取得し、得られた食細胞を用いることで、腎炎の原因微生物を検出および同定することができる。

【0024】次に、本明細書で使用する「食細胞」の語は、外来微生物を含めた異物を自身の細胞内に取り込むことのできる細胞を指すものであって、例えば、マクロファージ、単球、好中球、好酸球などが挙げられる。また、U937細胞、HL60細胞などの食細胞系も、本発明において好適に使用することができる。

【0025】食細胞（白血球）画分は、公知の方法によって臨床検体から取得することができる。例えば、約5mlのヘパリン加静脈血（白血球数の少ない場合は10ml）を採取し、この血液と血液分離試薬〔塩化ナトリウム225mgとデキストラン（分子量 200,000～300,000）1.5gを含み、滅菌精製水にて全量を25mlに調製したもの〕とを4：1程度の割合で混和した後、約10℃～約40℃で、約15分～約120分間、好ましくは、約37℃で、約

0分間静置することによって、白血球画分（上層）を取得することができる。

【0026】食細胞の固定

このようにして得た白血球画分を、約0℃～約20℃にて、約100×g～約500×gで、約3分～約60分間、好ましくは、約4℃にて、約140×g～約180×gで、約10分間遠心分離することによって、白血球を得ることができる。

【0027】遠心分離の際に赤血球が混入してしまった場合には、溶血操作を行うのが好ましい。例えば、白血球のペレットに滅菌精製水1mlを加えて懸濁した後、直ちに、過剰量のPBS〔塩化ナトリウム18.24g、リン酸一水素ナトリウム12水和物6.012gおよびリン酸二水素ナトリウム二水和物1.123gを含み、かつ滅菌精製水で全量を120mlに調製したもの（以下、単に『PBS原液』と称する）を、滅菌精製水で20倍に希釈して得たもの〕

（以下、単に『PBS』と称する）を加えて等張化した後、再度、約4℃の温度下にて、約140×g～約180×gで、約10分間遠心分離する。

【0028】あるいは、このような遠心分離を行わなくとも、食細胞が本質的に有する接着能力を利用して、以下のようにして、スライドグラスに接着させることもできる。白血球を固定する方法として、例えば、カルノア固定を行うことができる。具体的には、白血球を支持できる担体（支持担体）に白血球のペレットを載置し、カルノア固定液（エタノール：クロロホルム：酢酸＝6：3：1で混合して得た液）に20分間程度浸した後、約50%～約90%、好ましくは、約75%のエタノール液に約5分間浸して、完全に風乾する。

【0029】このような支持担体としては、不溶性素材から形成されたものが好ましく、例えば、ガラス、金属、合成樹脂（ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリル酸エステル、ナイロン、ポリアセタール、フッ素樹脂など）、多糖類（セルロース、アガロースなど）が好適に使用できる。不溶性支持担体の形状としては、例えば、板状、盆状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、管状等の種々の形状とすることができる。

【0030】特に、本発明の実施態様において好ましい支持担体として、スライドグラスがある。このようなスライドグラスとして、例えば、スライドグラス（商品番号MS311BL：日本エアーブラウン社製）がある。このMS311BLスライドグラスは、その表面に、直径5mmの円形ウェルを14個有している。

【0031】また、実際の適用を考慮すれば、支持担体への細胞の接着性を改善する目的で、3-アミノプロピルトリエトキシシラン（APS、SIGMA社）を、その表面にコートしてなるAPSコートスライドグラスが好ましい。その他に、ポリ-L-リジンやゼラチンをコートしてなるスライドグラスも好適に使用できる。これらAPSコー

トスライドガラスの作製手順は、まず、スライドホルダーにスライドガラスを固定する。固定したスライドガラスを、希釈した中性洗剤に30分以上浸して洗浄し、水道水で洗剤を十分に除去し、精製水で洗浄した後に、高温(100℃以上)で十分に乾燥させ、その後、室温で放置冷却する。次いで、スライドガラスを2%APS含有アセトンに1分間浸し、直ちにアセトンおよび滅菌精製水で順次軽く洗浄した後に、風乾する。さらに再度、スライドガラスを1~10%APS含有アセトンに1分間浸し、直ちにアセトンおよび滅菌精製水で順次軽く洗浄した後に、風乾を行った後、約20℃~約60℃、好ましくは約42℃で乾燥させることで、APSコートスライドガラスが得られる。

【0032】APSコートスライドガラス表面に白血球を支持させる場合、各ウェルに白血球が単層に広がるように塗抹して、風乾するのが好ましい。固定化する食細胞の密度(x 個/ml)は、約 5×10^6 個/ml $< x$ 個/ml $< 1 \times 10^8$ 個/ml、好ましくは、約 1×10^7 個/ml $\leq x$ 個/ml $\leq 5 \times 10^7$ 個/mlに調整する。また、これに対応して、APSコートスライドガラスに固定される1ウェル当たりの白血球の細胞数(y 個/ウェル(直径5mm))は、約 2.5×10^4 個/ウェル $< y$ 個/ウェル $< 5 \times 10^6$ 個/ウェル、好ましくは、約 5×10^4 個/ウェル $\leq y$ 個/ウェル $\leq 2.5 \times 10^6$ 個/ウェルに調整する。

【0033】具体的には、白血球画分を、約4℃にて、約 $140 \times g$ ~約 $180 \times g$ で、10分間遠心分離して得た白血球ペレットに、少量のPBSを加えて懸濁し、血球計算盤を用いて白血球数を計測する。

【0034】そして、約 5×10^4 個/ウェル~約 2.5×10^6 個/ウェルの細胞数となるようにPBSで調製した白血球懸濁液 $5 \mu l$ を、APSコートスライドガラスの各ウェルに白血球が単層に広がるように塗抹し、完全に風乾させることによって、白血球がその表面に固定支持されたAPSコートスライドガラスが調製される。

【0035】細胞膜の透過性充進処理
食細胞の細胞膜の透過性を充進させるための処理を行う。この処理方法として、白血球が固定支持されたAPSコートスライドガラスを、PBSに約3~約30分間浸し、その後、酵素前処理試薬(サポニン1.25g、 α -オクチルフェノキシポリエトキシエタノール(比重1.068~1.075)(20/4℃)、pH(5w/v%) 5.5~7.5) 1.25ml、PBS原液25mlを混合し、滅菌精製水にて全量50mlに調製したものを、滅菌精製水で約2~約50倍に希釈した溶液に浸し、振とう機で約3~約30分間振とうする方法を用いることができる。

【0036】内在細菌DNAの取得
次に、食細胞内に存在する感染症原因菌のDNAを得る。
具体的には、まず、スライドガラス1枚につき酵素試薬(N-アセチルムラミダーゼ、リゾチームおよび/またはリゾスタフィン; 以下、単に『酵素試薬』と称する)

に対して、酵素試薬溶解液(フェニルメチルスルフォニルフルオリド(PMSF)含有ジメチルスルフォキシド(DMSO)を、PBSで100倍希釈したもの]を1ml加えて酵素試薬を調製した。その後、約20℃~約60℃、好ましくは、約37℃~約42℃の湿潤箱内で、この酵素試薬1mlを白血球塗抹部位に滴下して、約10~約60分間静置して、感染症原因菌のDNAを露出する。その後、0.2mol/lの塩酸を含むPBS(PBS原液に塩酸を加え、滅菌精製水で20倍希釈して、塩酸の終濃度を0.2mol/lに調製したもの)に浸し、そのまま振とう機上で約3~約30分間振とうする。

DMSOは、5%以上の濃度でリゾチームおよびリゾスタフィンの活性を低下させる可能性があるため、5%未満の濃度で使用するのが好ましい。

【0037】食細胞の形態を保持させる物質であるPMSF以外に、他の公知のプロテアーゼ阻害剤、例えば、トシルリジンクロロメチルケトン(TLCK)およびそれらの混合物などを用いることもできる。そのような場合は、DMSOなどの溶解剤を適宜変更すればよい。

【0038】酵素試薬として用いられる各酵素の力価範囲は、次の通りである。リゾスタフィンの力価範囲は、約1単位/ml~約1,000単位/ml、好ましくは、約10単位/ml~約100単位/mlである。また、N-アセチルムラミダーゼの力価範囲は、約10単位/ml~約10,000単位/ml、好ましくは、約100単位/ml~約1,000単位/mlである。そして、リゾチームの力価範囲は、約1,000単位/ml~約1,000,000単位/ml、好ましくは、約10,000単位/ml~約100,000単位/mlである。なお、原因菌が真菌である場合には、ザイモラーゼの力価範囲は、約50~約500単位/ml、好ましくは、約100単位/ml~約500単位/mlである。また、ザイモラーゼを使用する場合、PMSFまたは公知のプロテアーゼ阻害剤を併用するのが特に好ましい。

【0039】また、グラム陽性菌とグラム陰性菌の菌体成分の違い、すなわち、ペプチドグリカンまたはリポポリサッカライドの違いにより、使用酵素を適宜選択することができる。特に、グラム陽性菌とグラム陰性菌の種別にかかわらず、より効果的に菌体を溶菌させるために、2種類以上の酵素を使用することもできる。リゾチーム、リゾスタフィン、およびN-アセチルムラミダーゼの3種類の酵素を混合した酵素試薬を使用することによって、1種類の酵素に依った場合と比較して溶菌活性が高まる。

【0040】酵素試薬の至適酵素処理温度は、約26℃~約59℃、好ましくは、約37℃~約42℃に設定する。また、酵素試薬の酵素処理時間は、少なくとも約15分以上、好ましくは、約15分~約120分、あるいは、少なくとも約20分以上、好ましくは、約30分~約60分とする。

【0041】N-アセチルムラミダーゼに関しては、Enterococcus faecalisの熱処理乾燥粉末ならびにN-アセチルムラミダーゼと共に、2mmol/l 塩化マグネシウムを

含む5 mmol/l トリス塩酸緩衝液 (pH 6.0) 中にて、37℃で、5分間反応させた場合、600nmでの吸光度が下がる現象が認められる。また、*S. salivarius* (IFO 3350) の熱処理細胞を、37℃、pH 7.0の条件下で、1分間に1 μ gを溶菌する酵素活性を1単位とした場合、2,000単位/mg以上の活性を示すN-アセチルムラミダーゼを使用することが望ましい。

【0042】リゾチームに関しては、*Micrococcus luteus*とリゾチームと共に、PBS中にて、37℃で、5分間反応させた場合、600nmの吸光度が下がる現象が認められる。

【0043】また、*Micrococcus luteus*を、35℃、pH 6.2の条件下で、1分間に540nmの吸光度を0.001下げる時の酵素活性を1単位とした場合、50,000単位/mg以上の活性を示すリゾチームを使用することが望ましい。

【0044】リゾスタフィンに関しては、*Staphylococcus epidermidis*とリゾスタフィンと共に、PBS中にて、37℃で、5分間反応させた場合、600nmの吸光度が下がる現象が認められる。また、*S. aureus*を、37℃、pH 7.5の条件下で、10分間で、620nmの吸光度を0.240から0.125に下げる酵素活性を1単位とした場合、500単位/mg以上の活性を示すリゾスタフィンを使用することが望ましい。

【0045】ザイモラーゼ (商品名: ザイモリエイス、生化学工業) は、*Arthrobacter lutesus*の培養液から調製された酵素で、酵母生細胞の細胞壁に対する溶解活性が大きい。ザイモラーゼに含まれる細胞壁溶解に関与する必須酵素は、 β -1,3-グルカン・ラミナリペンタオヒドロラーゼ (lanimaripentaohydrolase) であり、これは、 β -1,3-結合のグルコースポリマーに作用して、主生成物としてラミナリペンタオースを生成する。ザイモリエイス-100Tは、硫酸分画に精製され、さらにアフニティークロマトグラフィーにより精製された酵素であって (Kitamura, K. et al., J. Ferment. Technol., 60, 257, 1982)、100,000単位/gの活性を有している。しかしながら、この酵素の活性は、基質となる酵母の種類、培養条件および生育時期により変化することが知られている (Kitamura, K. et al., J. Gen. Appl. Microbiol., 20, 323, 1974; Kitamura, K. et al., Agric. Biol. Chem., 45, 1761, 1981; Kitamura, K. et al., Agric. Biol. Chem., 46, 553, 1982)。ザイモリエイス-100Tは、 β -1,3-グルカンナーゼを約 1.0×10^7 単位/g、プロテアーゼを約 1.7×10^4 単位/g、そして、マンナーゼを約 6.0×10^4 単位/gを含み、DNaseおよびRNaseは認められない (Kitamura, K. et al., J. Gen. Appl. Microbiol., 18, 57, 1972)。また、ザイモリエイスの至適pHは約5.5~約8.5であり、約6.5~約7.5のpHが特に至適性に優れており、至適温度は約25~約55℃であり、約35~約45℃の温度が特に望ましい。さらに、酵母 (対数増殖期細胞) に対する溶菌スペクトラム

(属名)として、*Ashbya*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Eremothecium*, *Endomyces*, *Hansenula*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Lipomyces*, *Helschkowia*, *Pichia*, *Pullularia*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis*, *Saccharomycodes*, *Schwanniomyces*などがある。特に、カンジダ属には、カンジダ・アルビカンズ、カンジダ・トロピカリス、カンジダ・パラシロシス、カンジダ・ガラクタ、カンジダ・ギリエルモンジ、カンジダ・クルセイ、クリプトコッカス・ネオフォーマンス等がある。

【0046】これらの属に属する菌も、本発明の適用対象に加えることができる。

【0047】ザイモラーゼの賦活剤として、SH化合物、例えば、システイン、2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトールなどを用いることができる。ザイモラーゼは、ビール酵母懸濁液を基質として、約25℃の温度下で、約2時間置いた反応液 (ザイモラーゼ: 0.05~0.1mg/溶液mlの1ml、基質: ビール酵母懸濁液 (2mg乾燥重量/ml) 3ml、緩衝液: M/15リン酸緩衝液 (pH 7.5) 5mlを含み、滅菌精製水1mlで全量を10mlに調製したもの) での A_{800} を30%減少するのに必要な酵素活性を1単位とする。なお、ザイモリエイス-100Tは、約100,000単位/gの活性を有している。

【0048】酵素試薬溶解液として用いられる (プロテアーゼから白血球を保護してその形態を保持させるために添加される) PMSFは、約10 μ mol/l 以上の濃度で効果が認められ、約0.1mmol/l 以上の濃度では、白血球の形態の劣化が完全に抑制されていたことから、約10 μ mol/l~約10mmol/l、好ましくは、約0.1mmol/l~約1mmol/lの範囲であることが好ましい。また、ジメチルスルフォキシド (DMSO) の濃度としては、約5%未満の濃度で使用でき、約2%以下の濃度が好ましく、約1%程度の濃度が最も好ましい。従って、酵素試薬溶解液としては、0.1mol/l PMSF含有DMSOを、PBSで約100~約1,000倍希釈して調製したものが好ましい。

【0049】感染症原因菌のDNAを得た後に、細胞膜タンパク質のアセチル化工程を加えてもよい。具体的には、アセチル化試薬 (トリエタノールアミン7.46gと適量の塩酸を含み、かつ適量の滅菌精製水で全量を50mlとしたもの) に無水酢酸を加え、滅菌精製水で約2~約50倍に希釈し、好ましくは、約10倍に希釈して、無水酢酸の終濃度を約0.1~約3.0%、好ましくは、約0.8%に調製したアセチレーション試薬にスライドグラスを浸し、振とう機上で5~30分間振とうする。その後、スライドグラスを、75%、85%、98%のエタノールに順に、それぞれ約2~約5分間ずつ浸して、完全に風乾させる。

【0050】また、アセチル化工程の後に、感染症原因菌のDNAをアルカリ処理する工程を挿入することができる。これにより、感染症原因菌のDNAは、一本鎖のDNAになる。具体的には、スライドグラスを、約10mmol/l

～約300mmol/l、好ましくは約70mmol/lの濃度の水酸化ナトリウムを含むPBS（PBS原液に水酸化ナトリウムを加え、滅菌精製水で約20倍希釈し、水酸化ナトリウムの終濃度を70mmol/lに調製したもの）に約2～約5分間浸して、アルカリ処理を行う。その後、スライドガラスを、75%、85%、98%のエタノールに順に、それぞれ約2～約5分間ずつ浸して、完全に風乾させる。

【0051】In situハイブリダイゼーション
ストリンジェントな条件下にて、感染症原因菌のDNAとハイブリダイゼーション可能な検出用DNAプローブを用いてin situハイブリダイゼーションを行う。

【0052】In situハイブリダイゼーションを実施するにあたって、まず、プローブ希釈液を用いて調製した検出用DNAプローブ含有液（プローブ液）を塗抹部位に塗布し、約25℃～約50℃、好ましくは、約37℃～約42℃の湿潤箱内で、約1～約3時間、好ましくは、約2時間静置させる。その後、ハイブリダイゼーション洗浄液〔ハイブリダイゼーション原液（塩化ナトリウム13.15gとクエン酸三ナトリウム2水和物6.615gとを含み、滅菌精製水にて全量を75mlに調整したもの、以下、単に、『ハイブリダイゼーション原液』と称する）を、ハイブリダイゼーション原液：滅菌精製水：ホルムアミド＝5：45：50の割合で混合して調製したもの〕を3つの染色ビンに用意し、それぞれを順に、約35～約45℃、好ましくは、約42℃で、約10分間ずつ浸す。その後、PBSに浸したままで、振とう機上で、約5～約30分間振とうさせる。詳細には、プローブ希釈液は、サケ精子DNA 600 μ l、100 \times デンハート溶液50 μ l、前出のハイブリダイゼーション原液500 μ l、ホルムアミド2250 μ l、50%硫酸デキストラン1000 μ lを含んでいる。プローブ液には、15ngの各検出用DNAプローブを含有せしめるのが好ましく、プローブ希釈液にて全量を50 μ lとするのが望ましい。

【0053】シュードモナス・アエルギノーザのプローブ濃度は、約0.6～約1.8ng/ μ l、好ましくは、約0.6～約1.2ng/ μ lとする。また、約0.06ng/ μ lの濃度では検出が不調（以下、「不適」と称する）であり、また、約0.6ng/ μ lの濃度では検出可能（以下、「適」と称する）であったことから、少なくとも約0.1ng/ μ l以上の濃度に調整すべきである。さらに、約2.4ng/ μ lの濃度では「不適」であり、また、約1.8ng/ μ lの濃度では「適」であったため、約2.2ng/ μ l以下の濃度に調整すべきである。また、陽性コントロールおよび陰性コントロールの至適濃度は、それぞれ約0.4～約2.0ng/ μ lおよび約0.6～約2.0ng/ μ lとし、好ましくは、両者共に約0.6～約1.0ng/ μ lの濃度とする。

【0054】また、ハイブリダイゼーションの試験時間は、少なくとも約30分以上、好ましくは、約60分以上、より好ましくは、約90分以上とする。最も好ましくは、ハイブリダイゼーション時間を120分～900分に設定

すべきである。

【0055】In situハイブリダイゼーションの実施において、検出感度を高める観点からして、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)などの界面活性剤の使用が好ましい。

SDSの好ましい濃度は、約1%以下、好ましくは、約0.1%～約0.5%、より好ましくは約0.25%である。SDSは、ハイブリダイゼーションの際に用いる溶液に添加されていればよく、プローブ希釈液またはプローブ液に事前に混合して用いてもよい。

【0056】また、DNAプローブとしては、約350～約600塩基長、好ましくは、約350～約550塩基長、最も好ましくは、約350～約500塩基長の長さを有する1種以上のDNAプローブとするのが好ましい。これはすなわち、食細胞内へのプローブの導入を円滑にし、かつ取り込まれている外来微生物の遺伝子への確実な接触が許容されることによる。ところで、プローブの塩基長は、必ずしも前出の範囲に限定される必要はなく、プローブの塩基長分布におけるピーク値が、主としてこの数値内に入っていればよいことを意味するものである。これらプローブは、1種だけを利用してもよく、また、1種以上を併用してもよい。1種以上のプローブとは、一つの菌種に対してハイブリダイズ可能な複数種のプローブであってもよく、あるいは、一つの菌種に対するプローブは1種であるが、菌種が複数種存在するためにプローブの種類が複数種となっていてよく、これらの場合、プローブの種類が1種以上になることを制限するものではない。

【0057】なお、プローブは、食細胞自体との交差反応性に乏しい（ハイブリダイズしない）配列を有するDNA断片を含むものとするのが好ましく、プローブの起源種と異なる他の菌種に由来する遺伝子とハイブリダイズするものであってはならない。

【0058】例えば、サブトラクション法を用いれば、短時間で特異プローブを作成することができる。これらプローブは、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、ビオチン、ジゴキシゲニン（ジゴキシゲニン(DIG)-11-dUTP）等の非放射性同位体標識用物質を用いて、定法のニックトランスレーション法に従って、調製およびラベルすることができる。プローブの鎖長は、ニックトランスレーション反応において添加するDNase IとDNAポリメラーゼIの量比を変化させることによって、最も効率よく標識付け可能なように制御できる。

【0059】一例として、本願発明のプローブPA-13-3（配列番号：6）の2 μ gを効率よくラベル化し、また、外来微生物DNAと効率よくin situハイブリダイズ可能なプローブ鎖長（350～600）にするためには、全量100 μ lの反応液中に、10U/ μ lのDNAポリメラーゼIの2 μ lに対し、全量100 μ lの反応液中に約10～約350mU、好ましくは、約25～約200mU、より好ましくは、約50～約150mUに調製されたDNase Iを6 μ l存在するように調製す

る。この場合、各酵素の容量および反応液全量などは、上記した至適反応条件の比率が一定である限り、適宜変更してもよい。

【0060】換言すれば、全量100 μ lでの20UのDNAポリメラーゼIに対して、DNase Iの濃度を、約10～約350 mU、好ましくは、約25～約200mU、より好ましくは、約50～約150mUの濃度に調整する。さらに換言すれば、1単位のDNAポリメラーゼIに対して、約0.5/1000～約17.5/1000、好ましくは、約1.25/1000～約10/1000、より好ましくは、約2.5/1000～約7.5/1000単位のDNase Iを用いてニックトランスレーション反応を行うのが望ましい。また、1 μ gのDNAに関して着眼すれば、10UのDNAポリメラーゼIに対して、DNase Iを約5～約175mU、好ましくは、約12.5～約100mU、より好ましくは、約25～約75mUにすればよい。他のプローブに関しては、上記した至適反応条件を参考にして、DNA量、DNAポリメラーゼIおよびDNase Iに関する至適反応条件を決定することができる。加えて、効率よくラベル化でき、しかも外来微生物DNAと効率よくin situハイブリダイゼーションできるプローブ鎖長(約350～約600塩基長)に調節することもできる。

【0061】ところで、in situハイブリダイゼーションを実施する際に用いられる「ストリンジェントな条件」とは、例えば、ホルムアミド約30%～約60%、好ましくは、約50%の存在下、約30～約50 $^{\circ}$ C、好ましくは、約38～約42 $^{\circ}$ Cでインキュベートし、その後、洗浄を行う条件である。

【0062】In situハイブリダイゼーションを行った後、ブロッキングの工程を加えることもできる。具体的には、湿潤箱内でスライドガラス1枚につきブロッキング試薬(ウサギ正常血清2mlとPBS原液0.5mlを含み、かつ滅菌精製水にて全量を10mlに調製したもの)1mlを塗抹部位に滴下し、約15～約60分間静置する。その後、ブロッキング試薬を除去する。

【0063】ハイブリダイズシグナルの検出、菌由来の遺伝子(ゲノムDNAまたはRNA)とハイブリダイズした結果に生じるシグナルを検出するために、定法の抗原-抗体反応等を利用した呈色反応を行う。

【0064】すなわち、ハイブリダイゼーションを終えた試料を十分に洗浄した後に、ブロッキング処理を行い、次いで、抗FITC抗体、抗ジゴキシゲニン抗体などの接合物、例えば、アルカリホスファターゼ接合物を用いて処理し、その後、接合物の発色系にてシグナルを発色して、ハイブリダイゼーションの状況を確認する。例えば、プローブとして、ジゴキシゲニン-11-dUTPでラベルしたプローブを用いた場合、抗ジゴキシゲニン-アルカリホスファターゼ接合物を用い、一般に使用されるアルカリホスファターゼに対する基質(ニトロブルーテトラゾリウムおよび5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルホスフェート等)を利用して検出すればよい。

【0065】呈色反応の後に洗浄して得た塗抹標本は、ナフトールブラック、Fast Green(20mg/50ml、Wako Chemicals社製)等で対比染色を行い、光学顕微鏡によって検鏡すると細胞内シグナルが観察される。

【0066】詳細には、ハイブリダイゼーションによるシグナルを得るには、例えば、検出用DNAプローブとしてジゴキシゲニン標識DNAプローブを用いる場合には、標識抗体(アルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体溶液1.05単位、バッファーA(トリエタノールアミン746mg、塩化ナトリウム17.5mg、塩化マグネシウム6水和物20.3mg、塩化亜鉛1.36mg、ウシ血清アルブミン1000mgおよび適量の塩酸を含み、かつ滅菌精製水適量にて全量を100mlに調製したもの)12.6 μ lにて全量を14 μ lに調製したもの)を標識抗体希釈液(トリス-(ヒドロキシメチル)-アミノメタン8.48mg、塩化ナトリウム6.14mgおよび塩酸適量を含み、かつ適量の滅菌精製水で全量を0.7mlに調製したもの)で約10～約200倍、好ましくは、約50倍に希釈した標識抗体液を調製し、これを塗抹部位に10 μ lずつ滴下し、約15～約60分間静置する。

その後、標識抗体洗浄液(1mlのポリソルベート20と50mlのPBS原液を含み、かつ滅菌精製水にて全量を100mlに調製したもの)を約2～約50倍、好ましくは、約10倍に希釈した溶液に浸し、そのままの状態、振とう機上で約5～約30分間振とうする。この操作を2回繰り返した後、発色前処理液1(トリス-(ヒドロキシメチル)-アミノメタン6.06g、塩化ナトリウム2.92gおよび適量の塩酸を含み、かつ適量の滅菌精製水にて全量を50mlに調製したもの)と発色前処理液2(塩化マグネシウム6水和物5.08gを含み、かつ滅菌精製水にて全量を50mlに調製したもの)を等量混合し、滅菌精製水で5倍程度に希釈した発色前処理液に浸し、そのままの状態、振とう機上で約5～約30分間振とうする。

【0067】その後、スライドガラス1枚につき発色試薬(ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)/5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルホスフェイト(BCIP))1mlを、0.2 μ mシリンジトップフィルターを装着したディスボーズブルシリンジでろ過しながら、スライドガラスの塗抹部位に滴下し、湿潤箱中で約10 $^{\circ}$ C～約45 $^{\circ}$ C、好ましくは、約37 $^{\circ}$ Cで、約15～約60分間遮光静置する。その後、発色試薬洗浄液(トリス-(ヒドロキシメチル)-アミノメタン606mg、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム2水和物186mgおよび適量の塩酸を含み、かつ適量の滅菌精製水にて全量を50mlに調製したもの)を約2～約50倍、好ましくは、約10倍に希釈した溶液に約2～約10分間浸し、風乾した後、対比染色液(ファストグリーンFCF(食用緑色3号)50mgを含み、かつ適量の滅菌精製水にて全量を50mlに調製したもの)を約2～約50倍、好ましくは、約10倍に希釈した溶液、それに約0.1～約5%、好ましくは、約1%の酢酸溶液に浸す。その後、前出の発色試薬洗浄液を約2～約50倍、好ましくは、約10倍に

希釈した溶液に再度浸して余分の対比染色液を洗い流し、完全に風乾する。また、発色試薬は、個別に調製した試薬でもよい。

【0068】アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体溶液は、プロット用メンブレンに、ジゴキシゲニンをラベルしたDNAを1ngプロットし、プロッキング後、10,000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体溶液で処理し、発色基質(NBT/BCIP)を反応させると、DNAのプロット部位が発色し、ジゴキシゲニンがラベルされていないDNAで同様の操作をしても発色は認められないものを使用するのが望ましい。また、抗ジゴキシゲニン抗体は、ヒツジ由来のものが好ましい。詳細には、免疫処置したヒツジ血清より、イオン交換クロマトグラフィーと抗体カラムクロマトグラフィーを経て精製したものが好ましい。

【0069】発色試薬(NBT/BCIP溶液、pH 9.0~10.0)として、ニトロテトラゾリウムブルー(NBT)3.3mg、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルフォスフェイト(BCIP)1.65mg、N,N-ジメチルホルムアミド99μg、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン121mg、適量の塩酸、塩化ナトリウム58.4mg、および塩化マグネシウム6水和物101.6mgを含み、かつ適量の滅菌精製水にて全量を10mlに調製したものが好ましい。この発色試薬としては、アルカリフォスファターゼをラベルしたタンパク質をプロット用メンブレンにプロットし、発色試薬でメンブレンを遮光室温で処理すると、プロット部位に暗紫色のシグナルが現れる試薬が好ましい。

【0070】このような対比染色を行う場合、シグナルと細胞のコントラストをさらに明確にさせるため、食用色素、例えば、黄色4号(タートラジン)を使用することができる。その理由として、基質によって紫色を呈色し、また、ナフトールブラックにより青色を呈色するなど、発現した色が互いに類似していると、明確な対比染色が行いにくいことが挙げられる。これまでに試されなかった食用色素を用いたところ、対比染色時の色相の差異が明確になり、実用的であることが判明した。

【0071】ところで、ジゴキシゲニンを標識化する方法として、ニックトランスレーション法を用いることができる。また、ジゴキシゲニンを標識化するその他の方法として、PCR法、ランダムプライマーラベリング法、in vitroトランスクリプションラベリング法、ターミナルトランスフェラーゼラベリング法なども使用可能である。

【0072】交差反応の有無の判定は、光学顕微鏡で鏡検(×1,000)した際に、単一ウェルにおいて、対比染色液によって染色された細胞において、青紫色の発色が1つでも認められた場合に陽性と判定する。

【0073】また、検出用プローブの調製方法は、特許第2965544号を参照することで明らかになろう。

【0074】さらに、本発明のプローブ(PA-2-31、配列番号:3)を、例えば、ワーキングセルバンクから釣菌して培養するには、ワーキングセルバンク(PA-2-31)を、白金耳または使い捨てプラスチックループ等で釣菌して、これを滅菌シャーレ内に置いた50μg/mlアンピシリン含有L-ブロス固形培地に画線塗抹する。一晚培養した後、シングルコロニーを採取し、50μg/mlアンピシリン含有のL-ブロス培地5mlに植菌して、37℃で終夜振とう培養する(前培養)。次いで、前出の固形培地400mlが入った培養用フラスコに、前培養液を2.5mlずつ植菌して、約37℃で終夜振とう培養する(本培養)。

【0075】そして、PA-2-31のプラスミドDNAを抽出すべく、本培養した培養液を約4℃にて、約4,000×gで10分間遠心分離して集菌する。培養上清を除去し、STE(10mmol/l トリス塩酸(pH 8.0)、1mmol/l エチレンジアミン-四酢酸2ナトリウム塩(EDTA)、0.1mmol/l 塩化ナトリウム)を20ml加えて菌体を再懸濁し、約4℃にて、4,000×gで10分間遠心分離して集菌する。

10mg/ml リゾチームを含む溶液-1(50mmol/l グルコース、25mmol/l トリス塩酸(pH 8.0)、10mmol/l EDTA)5mlを加え、菌体を懸濁して、室温で5分間放置する。

溶液-2(0.2mmol/l 水酸化ナトリウム、1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS))10mlを加え、転倒混和して、氷上で10分間放置する。氷冷した溶液-3(3mol/l 酢酸カリウム(pH 4.8))7.5mlを加え、転倒混和して氷上で10分間放置する。高速冷却遠心機を用いて、約4℃にて、約45,000×gで30分間遠心分離した後、上清を回収し、室温になるまで放置する。その後、0.6容量(約24ml)のイソプロパノールを加え、転倒混和して、室温で15分以上放置する。高速冷却遠心機を用いて、約25℃にて、約28,000×gで30分間遠心分離した後、上清を捨て、70%エタノールでペレットを洗浄し風乾する。風乾した後、TE(10mmol/l トリス塩酸(pH 8.0)、1mmol/l EDTA)を8ml加えて、溶解する(プラスミドDNAの抽出)。

【0076】次に、PA-2-31含有プラスミドDNAの精製を行う。得られたプラスミドDNAに、10mg/ml エチジウムブロマイド800μlおよび塩化セシウム8.6gを加え、転倒混和して溶解させる。その溶解液を超遠心用チューブに入れ、キャップまたはシールをする。垂直型ローターにより、約20℃にて、500,000×gで5時間超遠心した後、紫外線ライト照射下で注射筒または注射針を使用して、プラスミドDNAのバンドを分取する。分取したプラスミドDNA溶液に、等量のTE飽和1-ブタノールを加えて転倒混和し、微量高速遠心機を用いて、約15,000×gで、5分間遠心分離し、上清を取り除く。この操作を繰り返し、プラスミドDNA溶液中のエチジウムブロマイドを取り除く。次に、TEを加えて1.5mlの体積とし、脱塩カラム(NAP-10)で脱塩する。脱塩したプラスミドDNA溶液に、3mol/l 酢酸ナトリウム溶液を30

μ l加えて混和した後、3倍量の99.5%エタノールを加えて転倒混和し、 -20°C で、30分以上放置する。その後、微量冷却高速遠心機を用いて、 4°C にて、 $15,000\times g$ で20分間遠心分離して上清を除いた後、冷70%エタノールを加えて懸濁する。そして、再度、微量冷却高速遠心機を用いて、 4°C にて、 $15,000\times g$ で20分間遠心分離して上清を除き、プラスミドDNAの沈渣を減圧下で乾固させる。プラスミドDNAに $100\mu\text{l}$ のTEを加えて完全に溶解させ、 260nm の吸光度で濃度を測定する (PA-2-31含有プラスミドDNAの精製)。その後、PA-2-31含有プラスミドDNAの制限酵素処理、およびアガロース電気泳動によるPA-2-31のサイズチェックを行う。

【0077】PA-2-31含有プラスミドDNAの制限酵素処理およびアガロース電気泳動によるPA-2-31の精製を行う。そのために、分子量確認が終了したPA-2-31含有プラスミドDNA 1mg を、制限酵素HindIII単独もしくは他の制限酵素と組み合わせて、 37°C で、1.5時間以上の

時間をかけて反応を進行せしめることにより消化する。

【0078】プラスミドDNAを消化した後、反応液の一部を0.8%アガロースで電気泳動して、消化が完全に終了したことを確認する。消化を確認した後、分取用の0.8%アガロースゲルで電気泳動し、PA-2-31のバンドを採取する。採取したPA-2-31をアガロースゲルから抽出および精製して、吸光度計にてその濃度を測定する。

【0079】精製したPA-2-31の一部を、0.8%アガロースゲルで電気泳動し、シングルバンドであることを確認する。

【0080】PA-2-31のラベル化を行う。そのために、精製したPA-2-31の $2\mu\text{g}$ を用いて、以下の表1に記載の組成を有する反応液において、ジゴキシゲニンの標識付けを行う。

【0081】

【表1】

標識付用反応液の組成

	配合量 (μL)
DNAプローブ	X
$10\times\text{L.B.}^{\text{a}}$	10
100mmol/L ジチオスレイトール	10
dNTPs ^b (A、G、C 0.5mmol/L)	4
ジゴキシゲニン-dUTP ^c (0.4mmol/L)	5
DNase I ^d	6
$10\text{U}/\mu\text{L}$ DNAポリメラーゼ I	2
滅菌精製水	Y
合 計	100

【凡例】

(a) $10\times\text{L.B.}$: 0.5mol/L トリス塩酸 ($\text{pH } 7.5$)、
 50mmol/L 塩化マグネシウム、
 0.5mg/mL ウシ血清アルブミン

(b) dNTPs : 0.5mmol/L 2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸、
 0.5mmol/L 2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸、
 0.5mmol/L 2'-デオキシチジン-5'-三リン酸

(c) ジゴキシゲニン-dUTP : 0.4mmol/L ジゴキシゲニン-11-2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸

(d) DNase I : デオキシリボヌクレアーゼ I を、全量 $100\mu\text{L}$ あたり $50\sim 150\text{mU}$ の使用量となるよう 25mmol/L トリス塩酸 ($\text{pH } 7.5$)、 50% グリセリン溶液で希釈して上記配合量とする。

【0082】表1において、「X」とは、プローブ原液の濃度に応じて好ましいプローブ濃度となるように添加することができる容量を指し、この容量に伴い精製水量Yを決定して最終容量を調整する。

【0083】標識付した後、反応液にTEを $100\mu\text{l}$ 加えて反応を停止させる。反応停止液をスピカラムに注入し、約 4°C にて、約 $380\times g$ で約10分間遠心分離して、遊離のヌクレオチドを除く。次に、溶出液の濃度を吸光度計により測定し、TEで約 $10\text{ng}/\mu\text{l}$ に調製する。

【0084】標識付けを確認するために、標識付けしたPA-2-31の $0.5\mu\text{l}$ をメンブレンに滴下して、風乾する。

ブロッキング試薬にこのメンブレンを浸し、室温で30

分間ブロッキングする。 0.1mol/L トリス塩酸 ($\text{pH } 7.5$) と 0.15mol/L 塩化ナトリウムで5,000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体溶液に、そのメンブレンを室温で30分間浸す。 0.1mol/L トリス塩酸 ($\text{pH } 7.5$) および 0.15mol/L 塩化ナトリウムにメンブレンを浸し、室温で約10分間振とうして、2回洗浄する。 0.5mol/L トリス塩酸 ($\text{pH } 9.5$)、 0.15mol/L 塩化ナトリウム、 50mmol/L 塩化マグネシウムに、室温下で、メンブレンを約10分間浸す。室温および遮光下で、発色試薬にメンブレンを、約10分間浸す。メンブレンをTEに浸し、発色を停止させる。スポット下部の青紫色の発色で、標識付の確認を行う。

【0085】 1ml のディスボーズブルシリンジに、少量

の滅菌済みグラスウールを充填してスピнкаラムを作製する。 1 mmol/l トリス塩酸 (pH 7.5)、1 mmol/l の EDTA、0.1% SDS で膨潤させたセファデックス G-50 をシリンジに詰める。 15 ml のディスポーザブルコニカルチューブにシリンジを入れ、約 4℃ にて、約 320×g で約 10 分間遠心分離し、余分の緩衝液を落とす。 ディスポーザブルコニカルチューブからシリンジを抜き、排出された緩衝液を捨てた後、1.5 ml のエッペンドルフ型チューブをディスポーザブルコニカルチューブの底に入れ、その上にシリンジを入れる。

【0086】ドットブロットハイブリダイゼーションプローブの特異性を確認するために、以下の手順に従って、ドットブロットハイブリダイゼーションを行う。

【0087】まず、スポットした各ゲノム DNA を変性するために、定法に従い 0.5 mol/l 水酸化ナトリウム、1.5 mol/l 塩化ナトリウム溶液で飽和した沓紙 (ワットマン社製 3 MM) 上に、調製した各種細菌ゲノム 100 ng をナイロンメンブレン (ポールバイオダイナミクス B、日本ポール社製) にスポットし、風乾したメンブレンを 10 分間静置する。 次に、0.5 mol/l トリス塩酸 (pH 7.5)、1.5 mol/l 塩化ナトリウム溶液で飽和した前出の沓紙上に 10 分間静置して変性 DNA を中和する。 さらに 2×SSC (Standard Saline Citrate) 溶液で飽和した前記沓紙上に 5 分間静置し、洗浄する。

【0088】そして、メンブレンを風乾し、2×SSC 溶液にメンブレンを浸し、5 分間浸透する。 定法に従い、プラスチックバッグ内でプレハイブリタイゼーション溶液にメンブレンを浸し、42℃ で、60 分間親和させる。 プラスチックバッグ内でプローブ 400 ng を含むハ

イブリタイゼーション溶液の 15 ml にメンブレンを浸し、42℃ で、一晚反応させる。 次に、2×SSC、0.1% SDS (ラウリル硫酸ナトリウム) 溶液にメンブレンを浸し、5 分間洗浄する (この工程を 2 回繰り返す)。 その後、0.1×SSC、0.1% SDS 溶液にメンブレンを浸し、60℃ で、10 分間洗浄する (この工程を 3 回繰り返す)。 2×SSC 溶液にメンブレンを浸し、5 分間洗浄する。 メンブレンを 3% ウシ血清アルブミン、1% ブロッキングバッファー (ペーリンガー社製)、0.1 mol/l トリス塩酸 (pH 7.5)、0.15 mol/l 塩化ナトリウムを含む溶液にメンブレンを浸し、30 分間緩慢に振とうする。

【0089】次いで、アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体 (ペーリンガー社製) を、0.1 mol/l トリス塩酸 (pH 7.5) および 0.15 mol/l 塩化ナトリウム溶液で 5,000 倍希釈した溶液にメンブレンを浸し、30 分間緩慢に振とうする。 次に、0.1 mol/l トリス塩酸 (pH 7.5)、0.15 mol/l 塩化ナトリウム溶液にメンブレンを浸し、15 分間振とうする (この工程を 2 回繰り返す)。 0.1 mol/l トリス塩酸 (pH 9.5)、0.1 mol/l 塩化ナトリウム、5 mmol/l 塩化マグネシウムを含む溶液にメンブレンを浸し、5 分間振とうする。 NBT-BCIP 溶液 (GIBCO BRL 社製) にメンブレンを浸し、遮光下で発色反応させる。 TE (10 mmol/l トリス塩酸 (pH 8.0)、1 mmol/l EDTA) にメンブレンを浸し、発色反応を止め、風乾する。 プレハイブリダイゼーション溶液およびハイブリダイゼーション溶液の組成を、以下の表 2 に示す。

【0090】

【表 2】

【単位: ml】

	プレハイブリダイゼーション溶液	ハイブリダイゼーション溶液
ホルムアミド	7.5	6.75
20×SSC 溶液	3.75	3.75
100×デンハート溶液	0.75	0.15
0.5 mol/l リン酸緩衝液	0.75	0.6
滅菌蒸留水	1.5	1.95
10 mg/mL サケ精子 DNA	0.75	0.3
50% 硫酸デキストラン	----	1.5
合計液量	15.0	15.0

【0091】前述した in situ ハイブリダイゼーション工程において使用される界面活性剤としては、公知の界面活性剤が使用できる。

【0092】界面活性剤は、アニオン界面活性剤、非イオン性界面活性剤、カチオン界面活性剤および両性界面活性剤に大別される。

【0093】アニオン界面活性剤とは、陰イオン界面活性剤とも称されるものであって、水中で電離して有機陰イオンとなるものである。 界面活性剤の分子中の親油基を R として表現すると、RCOONa、RSO₃Na、RSO₄Na の式

で表される。 RCOONa のように弱酸性基を含有するものでは、その水溶液は加水分解しやすく弱アルカリ性を呈するが、RSO₃Na、RSO₄Na などの強酸性基を有するものでは、その水溶液は、加水分解を受けにくく、中性を呈する。 陰イオン性であるから、多量の陽イオン性物質の存在で界面活性を失うことがあり、また強酸性にした時にも失活する。

【0094】非イオン性界面活性剤とは、親水基が非イオン性のものをいう。 親水基として酸化エチレン基 (−CH₂CH₂O−) が多用され、この官能基の数が多くなるに従

って、親水性が増す。反対に、親油基の炭素数が増加すると、親油性が増加する。

【0095】従って、親水性・親油性を様々に変化させた界面活性剤が得られるのが特徴である。非イオン性界面活性剤は、水中で電離せず、無機塩の影響も受けにくいいため、生体に及ぼす作用も少ない。しかも、洗浄作用は、強力で、泡立ちは比較的少ないため、洗剤のみならず、医薬品、化粧品、食品などの様々な用途で利用される。水溶性の非イオン性界面活性剤は、温度が上昇すると、ある時点で水に溶解しにくくなり、水溶液が濁り出すが、これは親水基と水との水素結合が切断されるために生じる。

【0096】カチオン界面活性剤は、陽イオン界面活性剤とも称され、これは、水中で、電離して有機陽イオンとなるものである。カチオン界面活性剤は、一般に洗浄作用は大きくはないが、細菌などのアニオン性のものと強く結合するため、殺菌作用が大きい。また、繊維やプラスチックでの帯電防止能もある。代表的なカチオン界面活性剤であるドデシルトリメチルクロリド $[C_{12}H_{25}(CH_3)_3N]Cl$ は水溶性であるが、一方で、ジドデシルジメチルアンモニウムクロリド $[(C_{12}H_{25})_2(CH_3)_2N]Cl$ は水に溶解しにくく、水中では2分子膜状のベシクルを形成し、これはベンゼンには溶解する。

【0097】両性界面活性剤とは、分子内にアニオン基とカチオン基の両者を併せ持っている界面活性剤である。水溶液中での電離状態はアミノ酸に類似しており、両性界面活性剤には、アミノ酸誘導体が多く存在する。従って、アミノ酸と同様に等電点を有し、等電点よりアルカリ性側にある場合にはアニオン界面活性剤として、酸性側にある場合にはカチオン界面活性剤として作用する。等電点で水溶性は最低となり、表面張力も最も低下する。両性界面活性剤は、殺菌剤、帯電防止剤などの用途に用いられている。

【0098】また、アニオン界面活性剤は、カルボン酸型、スルホン酸型、硫酸エステル型およびリン酸エステル型に分類され、非イオン性界面活性剤は、エステル型、エーテル型、エステルエーテル型およびアルコールアミド型に分類される。カチオン界面活性剤は、アルキルアミン塩型および第四級アンモニウム塩型に分類され、両性界面活性剤は、カルボキシベタイン型、2-アルキルイミダゾリンの誘導型およびグリシン型に分類される。

【0099】さらに、アニオン界面活性剤のカルボン酸型は、脂肪酸モノカルボン酸塩、N-アシルサルコシン塩およびN-アシルグルタミン酸塩に細分される。それぞれの代表例として、脂肪酸モノカルボン酸塩として、ラウリン酸ナトリウムおよび薬用石鹼が、N-アシルサルコシン塩として、N-ラウロイルサルコシンナトリウム、N-アシルグルタミン酸塩、それに、N-ラウロイルグルタミン酸二ナトリウムなどがある。また、スルホン酸型

は、ジアルキルスルホコハク酸塩、アルカンスルホン酸塩、アルファオレフィンスルホン酸塩、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩、アルキル(分岐鎖)ベンゼンスルホン酸塩、アルキルナフタレンスルホン酸塩、ナフタレンスルホン酸塩-ホルムアルデヒド縮合物およびN-メチル-N-アシルタウリン塩に細分される。その代表例として、ジアルキルスルホコハク酸塩として、ジオクチルスルホコハク酸ナトリウム、アルカンスルホン酸塩はドデカンスルホン酸ナトリウム、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩には直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムが、また、アルキル(分岐鎖)ベンゼンスルホン酸塩として、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、アルキルナフタレンスルホン酸塩として、ブチルナフタレンスルホン酸ナトリウム、N-メチル-N-アシルタウリン塩としてはN-メチル-N-ステアロイルタウリンナトリウムなどがある。

【0100】また、硫酸エステル型は、アルキル硫酸塩、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩および油脂硫酸エステル塩に細分される。その代表例として、アルキル硫酸塩として、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウムおよびセチル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩はポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸トリエタノールアミンなどがある。また、リン酸エステル型は、アルキルリン酸塩、ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸塩およびポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルリン酸塩に細分される。その代表例として、アルキルリン酸塩として、モノラウリルリン酸二ナトリウムがある。

【0101】ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸塩には、リン酸ナトリウムポリオキシエチレンラウリルエーテルおよびリン酸ポリオキシエチレンオレイルエーテル(8MOL)がある。

【0102】非イオン性界面活性剤のエステル型は、脂肪酸グリセリン、脂肪酸ソルビタンおよび脂肪酸ショ糖エステルに細分される。それぞれの代表例として、脂肪酸グリセリンとして、モノステアリン酸グリセリン、脂肪酸ソルビタンとしてはモノステアリン酸ソルビタン、トリオレイン酸ソルビタン、セスキオレイン酸ソルビタン、モノラウリン酸ソルビタン、ポリソルベート20(ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル)、ポリソルベート60およびポリソルベート80、脂肪酸ショ糖エステルはステアリン酸ショ糖エステルがある。また、エーテル型は、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルおよびポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールに細分される。その代表例として、ポリオキシエチレンアルキルエーテルとして、ポリオキシエチレンラウリルエーテル、ポリオキシエチレンステアリルエーテルおよびポリオキシエチレンセチルエーテルなどがあり、ポ

リオキシエチレンアルキルフェニルエーテルとして、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテルおよびポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテルがある。また、エステルエーテル型は、脂肪酸ポリエチレングリコールおよび脂肪酸ポリオキシエチレンソルビタンに細分される。それぞれの代表例として、脂肪酸ポリエチレングリコールには、オレイン酸ポリエチレングリコールが、また、脂肪酸ポリオキシエチレンソルビタンには、パルミチン酸ポリオキシエチレンソルビタンおよびポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートなどがある。

また、アルカノールアミド型は、脂肪酸アルカノールアミドだけであり、ラウリン酸ジエタノールアミドがその代表例である。

【0103】カチオン界面活性剤のアルキルアミン塩型には、モノアルキルアミン塩、ジアルキルアミン塩およびトリアルキルアミン塩があり、モノステアリルアミン塩酸塩がその代表例である。また、第四級アンモニウム塩型は、塩化（または臭化、沃化）アルキルトリメチルアンモニウム、塩化（または臭化、沃化）ジアルキルジメチルアンモニウム、および塩化アルキルベンザルコニウムに細分される。それぞれの代表例として、塩化（または臭化、沃化）アルキルトリメチルアンモニウムとして、塩化ステアリルトリメチルアンモニウムが、塩化（または臭化、沃化）ジアルキルジメチルアンモニウムとして、塩化ジステアリルジメチルアンモニウムが、また、塩化アルキルベンザルコニウムとして、塩化ラウリルベンザルコニウムがある。

【0104】両性界面活性剤のカルボキシベタイン型には、アルキルベタインしかなく、ラウリルベタインが、その代表例である。また、2-アルキルイミダゾリンの誘導型としては、2-アルキル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタインだけであり、2-ウンデシル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタインが、その代表例として挙げられる。また、グリシン型として、アルキル（またはジアルキル）ジエチレントリアミノ酢酸があり、その代表例として、ジオクチルジエチレントリアミノ酢酸がある。

【0105】さらに、上掲のものに加えて、Triton X-100、ラウリルサルコシン、サポニン、BRIJ35、アルキルアリルポリエーテルアルコール、高級アルコール硫酸化物、N-ココイル-L-アルギニンエチルエステルDL-ピロリドンカルボン酸塩、N-ココイル-N-メチルアミノエチルスルホン酸ナトリウム、コレステロール、自己乳化型モノステアリン酸グリセリン、スクワラン、ステアリルアルコール、ステアリン酸ポリオキシシル40、セタノール、セトマクロゴール1000、セバシン酸ジエチル、ノニルフェノキシポリオキシエチレンエタン硫酸エステルアンモニウム、ポリオキシエチレンオレイルアミン、ポリオキシエチレンソルビットミツロウ、ポリオキシシル35ヒマシ

油、マクロゴール400、N-ヤシ油脂肪酸アシル-L-アルギニンエチル・DL-ピロリドンカルボン酸塩、ラウリルジメチルアミノオキシド液、ラウロマクロゴール、メチルセルロース、CMC（カルボキシメチルセルロース）、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油20およびポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、CHAPS、デオキシコール酸、ジギトニン、n-ドデシルマルトシド、ノニドットP40、n-オクチルグルコシド、オクチルチオグルコシド、ラウリル酸シュクロース、ドデシルポリ（エチレングリコールエーテル）n,n-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルフォネート等も利用することができる。

【0106】上掲の各種界面活性剤は、in situハイブリダイゼーションの工程において使用されることが重要であり、その使用法は特に限定されない。例えば、プローブ液またはプローブ希釈液中に混合されていてもよいし、プローブ液とは別に調製した界面活性剤を含有する溶液を、プローブ液を塗抹部位に塗布する前、同時または後に添加してもよいし、当業者は適宜変更することができる。

【0107】なお、本発明において、必要に応じて、陽性コントロールプローブを調製することもできる。例えば、まず、U937細胞（ATCC CRL-1593.2）のゲノムDNAの抽出と精製を行うために、37℃、5%炭酸ガスインキュベーター内で、RPMI1640培地（25ml）を入れた細胞培養フラスコ（175cm³）内でU937細胞を培養する。U937培養液を50mlの遠沈管に入れ、4℃にて、220×gで10分間遠心分離し、U937細胞を回収する。細胞を10mlのPBSで懸濁洗浄し、再度4℃にて、180×gで10分間遠心分離し、細胞を回収する。その後、上清を廃棄して、細胞を1mlの200μg/mlプロテナーゼK含有1%SDS含有TE溶液で懸濁し、37℃で30分間放置する。フェノール抽出を3〜4回繰り返す、除蛋白を行う。エタノール沈殿によって析出したゲノムを回収し、500μlの2.5μgリボヌクレアーゼ含有滅菌精製水に溶解し、42℃で30分間放置する。フェノール抽出を2〜3回繰り返す、除蛋白を行う。エタノール沈殿によって析出したゲノムを回収し、500μlのTEに溶解する。その後、吸光度計により濃度を測定し、ジギキシンゲンラベルに供することにより、陽性コントロールプローブを作製することができる。また、陽性コントロールプローブは、U937ゲノムを100ngスポットしたメンブレンに、陽性コントロールプローブをドットハイブリダイゼーションした時に、ハイブリッド形成が確認できるものを用いるのがよい。

【0108】同様に、必要に応じて、陰性コントロールプローブを公知の方法で調製することもできる。

【0109】その他の実施態様

本発明の検出方法を利用したシュードモナス・アエルギノザ菌の検出および／または同定用キットも、本発明によって提供される。本発明のキットによれば、DNA

を得る工程で使用される酵素 (DNA露出処理剤) が、少なくとも、リゾスタフィン、リゾチーム、N-アセチルムラミダーゼ、ザイモラーゼからなるグループから選択される1種以上の酵素、界面活性剤が添加されたプローブ液、それに、1種以上の検出用DNAプローブを具備している。本発明のキットには、以下の実施例に例示するような、血液分離試薬、酵素前処理試薬、酵素試薬、アセチル化試薬、プローブ液、ブロッキング試薬、標識抗体、標識抗体希釈液、発色前処理液-1、発色前処理液-2、発色試薬、対比染色液、PBS原液、ハイブリダイゼーション原液、標識抗体洗浄液、発色試薬洗浄液、APSコートスライドガラス、プローブ希釈液、バッファーA等を利用することが可能である。これらの内、少なくとも、酵素試薬とプローブ液とを含むことが好ましい。また、クロロホルム、エタノール、無水酢酸、DM SO、PMSF、ホルムアミド、酢酸、塩酸、水酸化ナトリウム等の各種試薬を用いることも可能である。さらに、低速遠心機、恒温器、血球計算盤、振とう機、湿潤箱、恒温槽、光学顕微鏡、可変式ピペット、採血管、チップ、ピペット、染色ビン、メスシリンダー、注射筒、0.2 μ mシリジトトップフィルターなどの器具を装備していてもよい。

【0110】本発明によれば、生体由来の食細胞を含む臨床検体中に含まれる、食細胞によって食された外来微生物の遺伝子をモニターする方法が提供される。

【0111】また、本発明によれば、原因菌の候補となる微生物の遺伝子を同定する工程を含み、同定された結果に基づいて敗血症原因菌または菌血症原因菌を特定する方法も提供される。この方法によれば、様々な敗血症が疑われた患者血液の診断に実際に応用したところ、投与された抗菌薬の影響を受けることなく、血液培養法に比べて約4倍の感度で起因菌を検出することができ、検出菌株の一致率は良好であることが明らかになっている。そして、血液培養では、検査に少なくとも3日以上、通常は14日程度を要するのに比較して、本発明の方法によれば全操作完了までに約8時間という極めて短時間の簡便な操作によって正確な結果を得ることができる。従って、この方法によれば、敗血症または菌血症などの、速やかに、かつ的確な対処が必要とされる感染症の診断や予後診断のモニター等において有用マーカーが提供されるのである。

【0112】また、本発明のプローブの塩基配列情報を参照してプライマーをデザインすれば、ハイブリダイゼーションを行わなくとも、PCR法によるDNAの増幅によって、感染症原因菌の同定も可能となるのである。

【0113】さらに、本願発明のプローブまたはその断片をDNAチップに組み込んで利用できることも明らかである。そうすれば、DNAチップを用いて、シュードモナス・アエルギノーザ菌の存在の確定が可能となる。

【0114】加えて、本発明で開示した塩基配列は、シ

ュードモナス・アエルギノーザ菌のゲノミックDNAをランダムにクローニングして得られたものであり、それ故、本発明の塩基配列の有用性はその相補鎖にまで及ぶものである。さらに、野性株が保有するDNAに変異部分が存在することは当然考えられるが、一般的に、本発明のプローブと70%程度、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上のホモロジーを有する塩基配列は、本発明の目的を達成することができると考えられるので、本発明にはこれら相同配列も当然に包含されるものである。

【0115】

【実施例】本発明を、実施例に沿って以下に詳細かつ具体的に説明するが、これら実施例の開示に基づいて、本発明が限定的に解釈されるべきでないことは勿論である。

【0116】実施例1：シュードモナス・アエルギノーザ菌検出用プローブの調製
臨床菌株シュードモナス・アエルギノーザ菌を、Brain Heart Infusion (BHI) 培地で一晚培養し、培養菌体を集菌して、溶菌工程においてN-アセチルムラミダーゼSGを加えた。そして、Saito-Miura変法 ("Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment", Biochem. Biophys. Acta vol. 72, pp.619-629 (1963)) に準じて、ゲノミックDNAを抽出した。

【0117】抽出したDNA 10 μ gを、10Uの制限酵素Hind IIIで完全消化し、ベクターpGEM-3Z (PROMEGA社製) にランダムクローニングした。クローン化されたプラスミドDNAを、後出の実施例3-(1)に記載の方法に従って抽出し、ナイロンフィルターに転写した。シュードモナス・アエルギノーザ標準菌株のゲノミックDNAをジギキゲン-11-dUTPでラベルしたものをプローブとして用い、サザンブロット・ハイブリダイゼーションを実施した。すなわち、ナイロンフィルターを45%ホルムアミド、5 \times SSC、42 $^{\circ}$ Cの条件下で終夜ハイブリダイゼーションを行った後、実施例2に記載の方法に従って、ナイロンフィルターの洗浄と発色を実施した。その結果、シュードモナス・アエルギノーザ菌ゲノミックDNAと特異的に反応した4種のプローブ (DNA断片) が選抜された。

【0118】ここで選抜された各プローブを、プローブPA-2-31、PA-3-12、PA-4-15、PA-13-3と命名した。

【0119】実施例2：プローブの種特異性の検討
実施例1で選抜した各プローブと各種感染症原因菌株のDNAとの反応性を、以下の方法により検討した。

【0120】まず、検討対象菌株として、下記表3に列挙した臨床分離株および寄託菌株を準備 (全64種類) した。

【0121】

【表3A】

	菌 種	取得源(寄託番号)
1	<i>E. coli</i>	ATCC 11775
2	<i>Salmonella typhimurium</i>	IFO 12529
3	<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>choleraesuis</i>	IFO 3163
4	<i>Salmonella enteritidis</i>	IFO 3313
5	<i>Citrobacter freundii</i>	臨床分離株
6	<i>Citrobacter koseri</i>	臨床分離株
7	<i>Citrobacter freundii</i>	臨床分離株
8	<i>Citrobacter freundii</i>	IFO 12681
9	<i>Citrobacter diversus</i>	JCM 1659
10	<i>Klebsiella oxytoca</i>	臨床分離株
11	<i>Klebsiella oxytoca</i>	臨床分離株
12	<i>Klebsiella oxytoca</i>	JCM 1655
13	<i>K. pneumoniae</i>	臨床分離株
14	<i>K. cloacae</i>	臨床分離株
15	<i>Pantoea agglomerans</i>	IFO 12686
16	<i>Serratia marcescens</i>	臨床分離株
17	<i>Serratia marcescens</i>	臨床分離株
18	<i>Serratia marcescens</i>	JCM 1239
19	<i>Hafnia alvei</i>	JCM 1666
20	<i>Edwardsiella tarda</i>	JCM 1656
21	<i>Proteus vulgaris</i>	臨床分離株
22	<i>Proteus vulgaris</i>	臨床分離株
23	<i>Proteus vulgaris</i>	IFO 3851
24	<i>Providencia stuartii</i>	臨床分離株
25	<i>Providencia stuartii</i>	IFO 12930
26	<i>Morganella morganii</i>	JCM 1672
27	<i>Vibrio vulnificus</i>	JCM 3725
28	<i>Vibrio proteolyticus</i>	IFO 13287
29	<i>Haemophilus influenza</i>	臨床分離株
30	<i>Haemophilus influenza</i>	臨床分離株
31	<i>Pantoea agglomerans</i>	JCM 1236
32	<i>Klebsiella aerogenes</i>	IFO 13541
33	<i>Klebsiella terrigena</i>	IFO 14941
34	<i>Klebsiella plauticola</i>	IFO 14939

【0122】

【表3B】

	菌 種	取得源(寄託番号)
35	<i>Enterobacter gergoviae</i>	JCM 1234
36	<i>Enterobacter intermedius</i>	JCM 1238
37	<i>Chromobacterium violaceum</i>	IFO 12614
38	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145
39	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	JCM 5963
40	<i>Pseudomonas putida</i>	JCM 8157
41	<i>Pseudomonas acidovorans</i>	JCM 5833
42	<i>Pseudomonas diminuta</i>	IFO 14213
43	<i>Pseudomonas cepacia</i>	臨床分離株
44	<i>Pseudomonas maltophilia</i>	JCM 1975
45	<i>Legionella pneumophila</i>	JCM 7571
46	<i>Bacteroides vulgatus</i>	JCM 5826
47	<i>Bacteroides fragilis</i>	臨床分離株
48	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	JCM 5827
49	<i>Pseudobacterium necrophorum</i> subsp. <i>funduliforme</i>	JCM 3724
50	<i>Micrococcus luteus</i>	JCM 1464
51	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 12200
52	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 14990
53	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433
54	<i>Streptococcus bovis</i>	IFO 12057
55	<i>Enterococcus durans</i>	IFO 13131
56	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	IFO 13956
57	<i>Streptococcus agalactiae</i>	JCM 5671
58	<i>Streptococcus pyogenes</i>	JCM 5674
59	<i>Streptococcus sanguinis</i>	JCM 5708
60	<i>Enterococcus faecium</i>	JCM 5804
61	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	臨床分離株
62	<i>Bacillus cereus</i>	IFO 15305
63	<i>Clostridium perfringens</i>	JCM 1290
64	<i>Lactobacillus brevis</i>	IFO 3345

【0123】そして、各臨床菌株に関して、実施例1に記載の方法に従って、各菌株が保有するDNAを抽出し、抽出したDNAの一定量（例えば、10～100ng）をナイロンフィルターにスポットして、アルカリ変性したものをドット・プロット・ハイブリダイゼーションの試料とした。次いで、Digoxigenin-11-dUTP（BRL社製）でラベルしたプローブで、マニアティスのマニュアル（T. Maniatis, et al., Molecular Cloning (A Laboratory Manual Second Edition), Cold Spring Harbour Laboratory (1989)）に従い、45%ホルムアミド、5×SSC、42℃の条件下で、終夜ハイブリダイゼーションを実施した。終夜ハイブリダイゼーションを終えた試料に関して、マニュアルに従い、55℃にて0.1×SSC、0.1%SDSによる20分間の洗浄を2回行った後に、Anti-Dig-ALP conjugates（BRL社製）で検出および発色させ、ハイブリダイゼーションの状況を確認した。

【0124】得られた結果は、図2～5に示すとおりである。図1は、ドット・プロット・ハイブリダイゼーションを行った各フィルターにスポットしておいたDNAの菌株の配置を示しており、図2は、プローブPA-2-31、図3は、プローブPA-3-12、図4は、プローブPA-4-15、そして、図5は、プローブPA-13-3を用いてハイブリダイゼーションを行ない、発色させた後の結果を示す。

【0125】図1～5に示した結果から明らかなように、いずれのプローブもシュードモナス・アエルギノー

ザ菌に由来するDNAに対してのみ反応性を示し、シュードモナス属の他の菌種由来のDNAに対して反応性（ハイブリッドの形成）が認められず、その種特異性が確認された。

【0126】実施例3：塩基配列の解析

実施例2で種特異性が確認されたプローブ（計4本）の塩基配列を、下記の方法に従って決定した。

【0127】(1) プラスミドDNAの調製

サブクローン化された（塩基配列を決定すべき）挿入断片をpGEM-3Z(Promega)に含んだ *Escherichia coli* K-12, JM109形質転換体を、5mlのLuria-BactaniMedium (bacto-tryptone, 10 g/l; bacto-yeast extract, 5 g/l; 塩化ナトリウム, 10 g/l; 5N 水酸化ナトリウムでpH 7.0に調整) に植菌し、一晚培養した。培養液を遠心分離（5,000rpm、5分間）して集菌した。沈殿物に2.5mg/mlの濃度でリゾチーム（Sigma）を含む50mMグルコース/50mM Tris-HCl (pH 8.0)/10mM EDTA溶液を100μl 加え、室温で5分間放置した。得られた懸濁液に1%の濃度でドデシル硫酸ナトリウム（Sigma）を含む0.2M水酸化ナトリウム水溶液を加えて混合した。5M酢酸カリウム水溶液（pH 4.8）150μl をさらに加えて混合し、15分間氷冷した。そして、遠心分離（15,000rpm、15分間）して得た上清を、フェノール/CHCl₃処理し、上清に2倍量のエタノールを加え、さらに遠心分離（12,000rpm、5分間）して沈澱を得た。この沈澱物を、10mM Tris-HCl (pH 7.5)/0.1mM EDTA溶液100μl に

溶解し、10mg/ml RNase A (Sigma) 溶液を加え、室温で15分間放置した。この調製物に0.1M酢酸ナトリウム水溶液 (pH 4.8) を300 μ l 加え、フェノール/CHCl₃ 処理し、上清にエタノールを加えて沈殿を得た。この沈殿物を乾燥し、10 μ l の蒸留水に溶解したものをDNA試料とした。

【0128】(2) 塩基配列決定の前処理

塩基配列決定の前処理を、AutoRead (登録商標) Sequencing Kit (ファルマシア製) を用いて行った。

【0129】まず、鋳型となるDNAの濃度が、32 μ l 溶液中に5~10 μ gとなるように調整した。1.5mlのミニチューブ (エッペンドルフ) に、鋳型DNA32 μ l を移し、2M水酸化ナトリウム水溶液を8 μ l 加えて穏やかに混合した。そして、軽く遠心した後、室温で10分間放置した。3M酢酸ナトリウム (pH 4.8) 7 μ l と蒸留水4 μ l を加え、さらにエタノールを120 μ l 加えて混合し、エタノール・ドライアイス上で15分間放置した。そして、15分間遠心分離して沈殿したDNAを集め、注意しながら上清を除去した。得られた沈殿物を70%エタノールで洗浄し、10分間遠心分離した。そして、注意しながら再度上清を除去し、減圧条件下で沈殿物を乾燥した。

【0130】沈殿物を蒸留水10 μ l に溶解し、蛍光性のプライマー [Fluorescent Primer, Universal Primer; 5'-Fluorescein-d [CGAGTTGTAAAACGACGGCCAGT (配列番号: 1)]-3', (1.6 pmol/ μ l ; 0.42A₂₆₀ unit/ml); Reverse Primer, 5'-Fluorescein-d [CAGGAACAGCTATGAC (配列番号: 2)]-3' (2.1 pmol/ μ l ; 0.42A₂₆₀ unit/ml)] 2 μ l (0.42A₂₆₀ unit/ml、4~6 pmol) とアニーリング用緩衝液2 μ l を加え穏やかに混合した。そして、軽く遠心した後、65°Cで5分間熱処理を行い、素早く37°Cの条件下に置き、そこで10分間保温した。保温後10分以上室温で放置し、軽く遠心した。そして、延長用緩衝液1 μ l とジメチルスルホキシド3 μ l を加えたものを試料とした。4本のミニチューブに、A、C、GおよびTと記入し、それぞれのチューブにA Mix (dd ATPをdATP、dCTP、c7dGTPおよびdTTPと共に溶解したもの)、C Mix (ddCTPをdATP、dCTP、c7dGTPおよびdTTPと共に溶解したもの)、G Mix (ddGTPをdATP、dCTP、c7dGTPおよびdTTPと共に溶解したもの) およびT Mix (dTTPをdATP、dCTP、c7dGTPおよびdTTPと共に溶解したもの) を、2.5 μ l ずつ分注した。なお、それぞれの溶液は使用時までには水中で保存し、使用時には37°Cで1分間以上保温してから使用した。希釈したT7 DNAポリメラーゼ (Pharmacia; 6~8 units/2 μ l) 2 μ l を、DNA試料に加え、ピベッティングもしくは穏やかな混合により、完全に混合した。混合後すぐに、この混合液を4.5 μ l ずつ保温しておいた4種の溶液に分注した。なお、分注に際しては、新しいチップを用いた。37°Cで5分間保温し、停止溶液を5 μ l ずつそれぞれの反応液

に加えた。この分注においても、新しいチップを用いた。90°Cで2~3分間保温し、すぐに水中で冷却した。

【0131】そして、電気泳動には、1レーン当たり4~6 μ l を泳動した。

【0132】(3) 塩基配列の決定

シュドモナス・アエルギノーザ菌が保有するDNAに対して特異性を有する4つのプローブ (実施例1~2) の塩基配列の決定を、泳動温度45°C、泳動時間6時間として、A.L.F. DNA Sequencerシステム (ファルマシア社製) を用いて行った。各上流と下流から明らかになった配列から順次プライマーをデザインし、上記の操作を繰り返した。

【0133】その結果、プローブPA-2-31 (配列番号: 3)、プローブPA-3-12 (配列番号: 4)、プローブPA-4-15 (配列番号: 5)、およびプローブPA-13-3 (配列番号: 6) の塩基配列それぞれの全容が、明らかになった。

【0134】実施例4: シュドモナス・アエルギノーザ菌の臨床検体からの検出

(1) 採血・血液検体の処理

臨床検体として、敗血症が疑われた患者より採取した血液10検体 (検体A~J) を用いた。各患者からヘパリン加静脈血10mlを採取し、採取した血液と血液分離試薬 (塩化ナトリウム225mg、デキストラン (分子量: 200,000~300,000) 1.5g、滅菌精製水にて全量25mlに調製したもの) を4:1の割合で混和した後、37°Cで30分間静置することにより、白血球画分 (上層) を取得した。このようにして得た白血球画分を4°Cにて160×gで10分間遠心分離することで、白血球を得た。次に、得られた白血球のペレットに滅菌精製水1mlを加えて懸濁し、直ちに過剰量のPBS (塩化ナトリウム18.24g、リン酸一水素ナトリウム12水和物6.012g、リン酸二水素ナトリウム2水和物1.123g、滅菌精製水にて全量120mlにしたもの (PBS原液) を滅菌精製水にて20倍に希釈したもの) を加えて等張化した後、再度4°C下で、160×gで10分間遠心分離した。

【0135】(2) 白血球の固定

3-アミノプロピルトリエトキシシラン (APS、SIGMA社) をスライドガラス (商品番号MS311BL、日本エアーブラウン社製) にコートしたAPSコートスライドガラスを使用した。

【0136】APSコートスライドガラスの作製に当たって、まず、スライドホルダーにスライドガラス (MS311BL) を固定した後、希釈した中性洗剤中に30分以上浸して洗浄し、水道水で洗剤を十分に取り除き、次に、スライドガラスを精製水にて洗浄し、高温 (100°C以上) で十分に乾燥させた後、室温で放置冷却した。その後、スライドガラスを2%APS含有アセトンに1分間浸し、直ちにアセトン及び滅菌精製水で順次軽く洗浄した後、風乾した。さらに再度、スライドガラスを2%APS含

有アセトンに1分間浸し、直ちにアセトンおよび滅菌精製水で順次軽く洗浄した。その後、風乾する操作を行った後に、42℃で乾燥させることで、APSコートスライドグラスを作製した。

【0137】白血球画分を、4℃にて160×gで10分間遠心分離することにより得た白血球ペレットに、少量のPBSを加えて懸濁し、血球計算盤を用いて白血球数を計測する。

【0138】細胞数が 1×10^5 個/ウェルとなるようにPBSで調製した白血球懸濁液5 μ lを、APSコートスライドグラスの各ウェルに白血球が単層に広がるように塗抹し、完全に風乾することにより、白血球をAPSコートスライドグラスに支持させた。

【0139】その後、カルノア固定液（エタノール：クロロホルム：酢酸＝6：3：1で混合して得た固定液）に20分間浸した後、75%エタノール液に5分間浸し、完全に風乾させた。

【0140】(3) 白血球細胞膜の透過性亢進処理
PBSに10分間浸した後、酵素前処理試薬（サポニン1.25g、*t*-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール（比重1.068～1.075(20/4℃)、pH(5w/v%) 5.5～7.5) 1.25ml、PBS原液25mlを混合し、滅菌精製水で全量を50mlに調製したもの）を滅菌精製水で10倍に希釈した溶液に浸し、振とう機で10分間振とうさせた。

【0141】(4) 菌体壁の溶菌酵素処理
スライドグラス1枚につき酵素試薬（N-アセチルラムナーゼ1,000単位/ml、リゾチーム100,000単位/mlおよび/またはリゾスタフィン100単位/ml）に酵素試薬溶解液（PBSで0.1mol/l フェニルメチルスルフォニルフルオリド(PMSF)含有ジメチルスルフォキシド(DMSO)を100倍希釈して調製したもの）を1ml加えて酵素試液を調製した。その後、感染症原因菌のDNAを得るために、37℃～42℃の湿潤箱中で、この酵素試液1mlを白血球塗抹部位に滴下し、30分間静置することによって、感染症原因菌のDNAを露出した。その後、0.2mol/l 塩酸含有PBS（PBS原液に塩酸を加え、滅菌精製水にて20倍希釈し、塩酸の終濃度を0.2mol/l に調製したもの）に浸し、そのまま振とう機上で10分間振とうさせた。

【0142】(5) 細胞膜タンパク質のアセチル化
アセチル化試薬（トリエタノールアミン7.46gと適量の塩酸を含み、適量の滅菌精製水で全量を50mlとしたもの）に無水酢酸を加え、滅菌精製水で10倍希釈し、無水酢酸の終濃度を0.8%に調整したアセチレーション試薬にスライドグラスを浸し、振とう機上で10分間振とうした。その後、75%、85%、98%エタノールに、順次3分間ずつ浸し、完全に風乾させた。

【0143】(6) 菌体DNAのアルカリ処理〔二本鎖DNAを一本鎖DNAに変性〕
スライドグラスを、70mmol/l 水酸化ナトリウム含有PBS（PBS原液に水酸化ナトリウムを加え、滅菌精製水で20

倍希釈し、水酸化ナトリウムの終濃度を70mmol/l に調製したもの）に3分間浸した。その後、75%、85%、98%エタノールに、順次3分間ずつ浸し、完全に風乾させた。

【0144】(7) ハイブリダイゼーション
プローブ希釈液（0.25%SDS、サケ精子DNA600 μ l、100×デンハート溶液50 μ l、ハイブリダイゼーション原液500 μ l、ホルムアミド2250 μ l、50%硫酸デキストラン1000 μ lが含まれる）にて調製したジゴキシゲニン標識DNAプローブ15ngを含有する液（プローブ液、1.0ng/ μ l）を塗抹部位に塗布し、37℃～42℃の湿潤箱内に2時間静置させた。ジゴキシゲニン標識DNAプローブは、ニックトランスレーション法で調製した。その後、ハイブリダイゼーション洗浄液（ハイブリダイゼーション原液（塩化ナトリウム13.15g、クエン酸三ナトリウム2水和物6.615g、滅菌精製水にて全量75mlに調製したもの、前出）をハイブリダイゼーション原液：滅菌精製水：ホルムアミド＝5：45：50の割合で混合して調製したもの）を3つの染色ビンに用意し、順次42℃で10分間ずつ浸した。その後、PBSに浸し、そのまま振とう機上で10分間振とうさせた。

【0145】ジゴキシゲニンを標識付けしたDNAプローブは、PA-2-31およびPA-13-3のプローブ配列を用いて、ニックトランスレーション法により調製した。

【0146】(8) ブロッキング
In situハイブリダイゼーションを行った後、ブロッキングの操作を行った。

【0147】具体的には、湿潤箱内にてスライドグラス1枚につきブロッキング試薬（ウサギ正常血清2mlとPBS原液0.5mlを含み、滅菌精製水で全量を10mlに調製したもの）1mlを塗抹部位に滴下し、これを30分間静置した。その後、ブロッキング試薬を除去した。

【0148】(9) 標識抗体との反応
標識抗体（アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体溶液1.05単位、バッファーA（トリエタノールアミン746mg、塩化ナトリウム17.5mg、塩化マグネシウム6水和物20.3mg、塩化亜鉛1.36mg、ウシ血清アルブミン1000mgおよび塩酸適量を含み、滅菌精製水適量で全量を100mlに調製したもの）12.6 μ lにて全量を14 μ lに調製したもの）を、標識抗体希釈液（トリス-（ヒドロキシメチル）-アミノメタン8.48mg、塩化ナトリウム6.14mgおよび適量の塩酸を含み、適量の滅菌精製水で全量を0.7mlに調製したもの）で50倍希釈した標識抗体液を調製し、この標識抗体液を塗抹部位に10 μ lずつ滴下し、これを30分間静置させた。その後、標識抗体洗浄液（1mlのポリソルベート20と50mlのPBS原液を含み、滅菌精製水で全量を100mlに調製したもの）を10倍に希釈した溶液に浸し、そのまま振とう機上で10分間振とうさせた。この操作を2回繰り返した後、発色前処理液1（トリス-（ヒドロキシメチル）-アミノメタン6.06g、塩

化ナトリウム2.92gおよび適量の塩酸を含み、適量の滅菌精製水で全量を50mlに調製したもの)と発色前処理液2(塩化マグネシウム6水和物5.08gを含み、滅菌精製水で全量を50mlに調製したもの)を等量混合し、滅菌精製水で5倍に希釈した発色前処理液に浸し、そのまま振とう機上で10分間振とうさせた。

【0149】(10) シグナル検出

スライドガラス1枚につき発色試薬〔ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)/5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルフォスフェイト(BCIP)溶液、pH 9.0~10.0: NBT 3.3mg、BCIP 1.65mg、N,N-ジメチルホルムアミド99μg、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン121mg、適量の塩酸、塩化ナトリウム58.4mgおよび塩化マグネシウム6水和物101.6mgを含み、適量の滅菌精製水で全量を10mlに調製したもの〕1mlを、0.2μmシリンジトップフィルターを装着したディスポーザブルシリンジを用いてろ過しながら、スライドガラスの塗抹部位に滴下し、湿潤箱内で、37℃で、30分間遮光静置させた。その後、発色試薬洗浄液(トリス(ヒドロキシメチル)-アミノメタン606mg、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム2水和物186mgおよび適量の塩酸を含み、適量の滅菌精製水で全量を50mlに調製したもの)を10倍に希釈した溶液に5分間浸し、風乾した後、対比染色液(ファストグリーンFCF(食用緑色3号)50mg、滅菌精製水にて全量50mlに調製したもの)を10倍に希釈した溶液および1%酢酸溶液に浸した。その後、前記発色試薬洗浄液を10倍に希釈した溶液に再度浸して余分の対比染色液を洗い流し、完全に風乾させた。

【0150】(11) 判定

判定は、光学顕微鏡で鏡検(×1,000)した場合に、単一のウェル内の対比染色液により染まった細胞に於いて、青紫色の発色シグナルが1つでも認められた場合に「陽性」と判定した。その結果、本発明の方法により、10検体の内の2検体でシュドモナス・アエルギノーザ菌を検出した。

【0151】その一例を、図6の矢印に示した。なお、図6に例示した結果は、PA-2-31およびPA-13-3を組み合わせて混合プローブとし、これにニックトランスレーションを適用して得たプローブを用いた場合のものである。また、本発明者らは、PA-2-31、PA-3-12、PA-4-15またはPA-13-3を単体で用いても、あるいはこれらの一部または全部を混合して用いても、臨床検体からシュドモナス・アエルギノーザ菌を検出することが可能であることを証明している。

【0152】実施例5: 塗抹固定する至適白血球(貪食細胞)数の検討

APSコートスライドガラスのウェル(直径5mmの円形ウェル)に塗抹する至適白血球数の検討を行った。

【0153】ヘパリン加健常ヒト血液10mlを採取し、実施例4(1)の記載に従って白血球を採取した。次に、

得られた白血球を、適量のPBSを用いて懸濁した後、血球計算盤を用いて1ml当たりの白血球数を測定し、(a) 1×10^8 個/mlを始点として、(b) 5×10^7 個/ml、(c) 1×10^7 個/ml、(d) 5×10^6 個/ml、(e) 1×10^6 個/ml、(f) 5×10^5 個/ml、および(g) 1×10^5 個/mlの希釈系列を調製した後、各々5μlをスライドガラスに塗抹した。風乾した後、カルノア固定(実施例4(2)参照)を行い、直ちに対比染色液で染色し、実施例4(11)に記載した方法を用いて判定を行った。

【0154】その結果、細胞数が 1×10^8 個/mlでは細胞数が過剰であり、検出不適であった。また、 5×10^6 個/ml以下では、ウェルに観察される細胞数が少なく、検出不適であった。よって、固定化する食細胞の密度(×個/ml)が、 5×10^6 個/ml < x 個/ml < 1×10^8 個/ml、好ましくは、 1×10^7 個/ml ≤ x 個/ml ≤ 5×10^7 個/mlに調製したものを使用するのが好ましいことが判明した。また、これに対応して、APSコートスライドガラスに固定される1ウェル当たりの白血球の細胞数(y個/ウェル(直径5mm))は、 2.5×10^4 個/ウェル < y 個/ウェル < 5×10^5 個/ウェル、好ましくは 5×10^4 個/ウェル ≤ y 個/ウェル ≤ 2.5×10^5 個/ウェルとなるように調製するのがよいことも判明した。

【0155】試料(a)~(f)に関する実験結果を、図7(a)~(f)に示した。

【0156】なお、試料(g)に関する実験結果の記載は省略してある。

【0157】実施例6: 溶菌酵素の選択

S. aureus (ATCC 12600)、*S. epidermidis* (ATCC 14990)、*P. aeruginosa* (ATCC 10145)、*E. faecalis* (ATCC 19433)、*E. coli* (ATCC 11775)を溶菌する酵素条件を検討した。

【0158】*S. aureus* および *S. epidermidis* に対しては、溶菌酵素としてリゾスタフィン(Bur. J. Biochem., 38, 293-300, 1973)を使用した。また、*E. faecalis* に対しては、N-アセチルラムミダーゼ(Archs. Oral Biol., 23, 543-549, 1978)とリゾチーム(生化学工業)を使用した。また、*P. aeruginosa* および *E. coli* については、70mmol/lの水酸化ナトリウム含有PBS(前出)を使用した。

【0159】上記各種細菌を、5mlのBHI(ブレインハートインフュージョン(DIFCO社製))液体培地に植菌し、37℃で、8時間以上培養した。培養した菌液を4℃、 $2,000 \times g$ で10分間遠心分離して集菌した。このようにして集めた菌をPBSに懸濁し試料とした。溶菌は、マイクロプレートリーダーを用い、吸光度600nmにおける菌液の濁度の減少により評価した。

【0160】その結果、*S. aureus* および *S. epidermidis* は、リゾスタフィンによって溶菌した。*P. aeruginosa* および *E. coli* については、70mmol/lの水酸化ナトリウム含有PBS(前出)によって溶菌したため、酵素処

理は不要であった。また、*E. faecalis*については、N-アセチルムラミダーゼ単独よりも、リゾチームと併用した方が優れた溶菌活性が得られることが判明した。また、食食作用を受けて取り込まれた菌が、例えば、*P. aeruginosa*および*E. coli*などである場合には、アルカリ処理に際して菌の細胞壁が溶解され、遺伝子が露出した状態となるので、必ずしもこの酵素処理を行う必要はない。また、アルカリ処理は、実施例4(6)に記載の手順に従って行うこともできる。しかしながら、確実に菌の細胞壁を溶解するのであれば、酵素処理を行う方がよいと考えられる。

【0161】本発明において外来微生物を溶解するために使用される前処理用の各酵素は、前述したような細菌株に対して有効であるのみならず、他のスタフィロコカス属、ストレプトコカス属、バシルス属およびマイクロコカス属を初めとする他の菌種等でも有効である。

また、かような酵素は、各々単独で用いることもできるが、菌が特定できていない臨床検体を使用する場合には、混合した場合の方が有効である。

【0162】なお、図8に、(a) *S. aureus*および*S. epidermidis*、(b) *P. aeruginosa*および*E. coli*、ならびに(c) *E. faecalis*に関して実施した試験結果を示した。

【0163】実施例7：酵素溶解液に関する検討（DMSOの至適濃度の検討）

酵素試薬に含有されるプロテアーゼは白血球の形態を劣化させるので、白血球の形態を保持させるために添加するPMSFの溶解剤である、DMSOの酵素活性に及ぼす影響を検討した。

【0164】*E. faecalis*を50mlのBHI液体培地（前出）に植菌し、37℃で8時間以上培養した。この培養液を、4℃で、2,000×gで10分間遠心分離して集菌し、PBSにて懸濁した後、オートクレーブ（120℃、10分）で熱処理を行った。次に、4℃で、2,000×gで10分間

酵素活性（菌濁度の減少）に対するDMSOの影響

DMSO 添加量(%)	N-アセチルムラミダーゼ O.D./5分間	リゾチーム O.D./3分間	リゾスタフィン O.D./10分間
0(対照)	79.3±4.8	0.689±0.028	0.168±0.017
0.1	75.0±3.2	0.678±0.026	0.164±0.009
1	75.8±2.8	0.660±0.026	0.160±0.008
2	75.8±2.5	0.653±0.024	0.145±0.009
5	76.3±4.9	0.566±0.017	0.124±0.006
10	73.8±3.5	0.464±0.016	0.094±0.006

【0169】実施例8：酵素溶解液に関する検討（PMSFの至適濃度の検討）

酵素試薬に含有されるプロテアーゼは、白血球の形態を劣化させるので、白血球の形態を保持させるために添加するPMSF（PIERCE社製）の効果を検討した。

遠心分離し、上清を捨て、1mlのPBSで沈渣を懸濁させた後、凍結乾燥させた。この凍結乾燥試料を、0～10%DMSO含有5mmol/l トリス-塩酸（pH 6.0）、2mmol/l 塩化マグネシウムで懸濁し、N-アセチルムラミダーゼに対する試料とした。また、*Micrococcus luteus*（JCM 1464）を、5mlのBHI液体培地（前出）に植菌し、37℃で8時間以上培養した。培養した菌液を4℃で、2,000×gで10分間遠心分離して集菌した。上清を捨て、菌のペレットを5mlのPBSで懸濁洗浄し、再度4℃にて、2,000×gで10分間遠心分離して集菌した。

【0165】このようにして集めた菌を、0～10%DMSO含有PBSで懸濁し、リゾチームに対する試料とした。

一方、*S. epidermidis*をリゾチームの場合と同様にして培養、集菌し、0～10%DMSO含有PBSで懸濁し、リゾスタフィンに対する試料とした。

【0166】酵素活性は、マイクロプレートリーダーを用い、吸光度600nmにおける試料の濁度の減少により評価した。ただし、本試験でのそれぞれの酵素力価は、(a)N-アセチルムラミダーゼ 300単位/ml、(b)リゾチーム 10,000単位/ml、(c)リゾスタフィン50単位/mlとし、酵素活性に対するDMSOの影響を検討した。それぞれの酵素活性を、単位時間当たりにおける菌濁度（O.D.=600nm）の減少で評価した結果、DMSOは、N-アセチルムラミダーゼ活性に対しては殆ど影響を与えなかったが、リゾチームおよびリゾスタフィンに対しては、共に5%以上のDMSOで活性の低下が認められた。また、2%以下のDMSOの濃度では、酵素活性の低下は認められなかった。ゆえに、PMSFを溶解させるDMSO濃度は少なくとも5%未満、好ましくは2%以下、さらには1%程度とするのが好ましい。

【0167】その検討結果を、図9(a)～(c)および下記表4に示した。

【0168】

【表4】

【0170】100μlのDMSO（和光純薬社製）にPMSFを溶解し、PMSFの終濃度が無添加～1mmol/lとなるようにPBSで10mlに希釈した。この溶液に、プロテアーゼの力価が0.2単位/mlとなるよう、プロテイナーゼK（ペーリンガーマンハイム社製）を添加した。ヘパリン加健常

ヒト血液5mlを採取し、実施例4(1)に記載の方法に従って白血球を採取した。次に、白血球を適当量のPBSで懸濁して、血球計算盤で細胞数を計測し、細胞数を、約 5×10^4 ～約 2.5×10^5 個/ウェルに調製し、その5 μ lをAPSコートスライドガラスのウェルに塗抹し、風乾した後、実施例4(2)に記載のカルノア固定法に従って固定した。

【0171】このサンプルを用いて、実施例4(3)および(4)に記載の方法に従って試験を行った。1 μ mol/l～1mmol/lのPMSFの濃度で試験を実施した結果、10 μ mol/l以上の濃度で効果が認められ、0.1mmol/l以上のPMSF濃度では、白血球の形態の劣化が完全に抑制されていた。

【0172】その結果を、プロテアーゼ0.2単位/mlのみ(図10(a))、PMSF 1 μ mol/ml添加(図10(b))、PMSF 10 μ mol/ml添加(図10(c))、PMSF 0.1mmol/ml添加(図10(d))、およびPMSF 1mmol/ml添加(図10(e))に、それぞれ示した。

【0173】実施例9：溶菌酵素ザイモラーゼの至適力価の検討

カンジダ・アルビカンスを溶菌して、そのDNAを得るためのザイモラーゼの至適力価を検討した。

【0174】カンジダ・アルビカンスをYPD培地に植菌し、30℃で一昼夜培養した。その後、基質としてカンジダ・アルビカンスをPBSにて懸濁した溶液(基質1)と、カルノア固定した後に、70%エタノールに浸し、風乾し、PBSにて懸濁した溶液(基質2)の2種類を調製した。

【0175】反応は、ザイモラーゼ/PBSを0.5ml、基質を1.5ml、そしてM/15リン酸緩衝液を2.5mlを含み、0.5mlの滅菌精製水で全量を5.0mlに調製したものをを用いた。

その後、37℃で、2時間反応させ、OD₆₀₀を測定した。また、ザイモラーゼ(ザイモリエイス-100T)濃度として、0mg/ml、0.01mg/ml、0.025mg/ml、0.05mg/ml、0.1mg/ml、0.25mg/ml、0.5mg/ml、1mg/ml、2.5mg/ml、5mg/mlのものをを用いた。

【0176】その結果、基質1を用いた場合のそれぞれのOD₆₀₀値は、0.533、0.521、0.553、0.554、0.548、0.417、0.394、0.288、0.163、0.113であり、基質2を用いた場合のそれぞれのOD₆₀₀値は、0.445、0.411、0.359、0.282、0.232、0.146、0.115、0.096、0.08、0.057であった。基質1および基質2共に、0.5mg/ml～5mg/ml、特に、1mg/ml～5mg/mlの濃度範囲が有効であることが判明した。

【0177】すなわち、ザイモラーゼの使用量は、50単位/ml～500単位/ml、特に100単位/ml～500単位/mlであることが好ましい。また、菌が特定できていない臨床検体を使用する場合には、真菌である場合も考慮してザイモラーゼを適宜添加するのが好ましい。

【0178】実施例10：至適酵素処理条件(力価)の検

討

(1) 食食サンプルの作製

(i) U937細胞の調製

37℃、5%炭酸ガスインキュベーター内で、RPMI 1640培地(25ml)を入れた細胞培養フラスコ(175cm³)内でU937細胞(ヒト単球株化細胞、ATCC CRL-1593.2)を培養した。次に、U937細胞培養液を50mlの遠沈管に入れ、4℃、220×gで10分間遠心分離し、U937細胞を回収した。その後、回収したU937細胞を、200 μ lのPBSで懸濁し、血球計算盤で細胞数を計算し、細胞数を約 1×10^4 個/ μ l～約 2×10^4 個/ μ lに調製した。

【0179】(ii) 細菌食食サンプルの調製

S. aureus、*S. epidermidis*、*P. aeruginosa*、*E. faecalis*、*E. coli*(いずれも前出)を、各々5mlのBHI培養液に植菌し、37℃で8時間以上培養した。

【0180】培養した菌液を、4℃、2,000×gで10分間遠心分離して集菌した。上清を捨てた後、菌のペレットを5mlのPBSで懸濁し、再度4℃、2,000×gで10分間遠心分離して集菌した。集菌した菌を5mlのPBSで懸濁した後、PBSにて希釈して、吸光度計により菌液の濁度(O.D.=600nm)を、*S. aureus*(0.01～0.03)、*S. epidermidis*(0.01～0.03)、*P. aeruginosa*(0.02～0.03)、*E. faecalis*(0.01～0.03)、*E. coli*(0.02～0.03)にしたものを15ml調製した。このようにして得た菌液は、別々の175cm³の培養用フラスコに移し、30分間室温で静置した。

【0181】ヘパリン加健常ヒト血液50mlを採取し、血球分離試薬を4:1の割合で加え、37℃で30分間静置し、白血球画分を分取し、これをPBSで50mlにした。培養用フラスコ内の上清を静かに捨て、PBSで希釈した白血球画分を10mlずつフラスコに加え、室温で10分間静置した。培養用フラスコ内の上清を捨て、フラスコの底に付着した白血球を0.02%EDTA含有PBS 10mlで15mlの遠沈管に回収し、4℃、140×g～180×gで10分間遠心分離し、白血球を収集した。収集した白血球に赤血球の混入が認められたので、1mlの滅菌精製水にて白血球の沈渣を穏やかに懸濁して溶血させた後、PBSを14ml加えて等張化し、再度4℃、140×g～180×gで10分間遠心分離を行い、白血球を収集した。収集した白血球をPBSで懸濁し、血球計算盤にて細胞数を計測し、 1×10^4 個/ μ l～ 5×10^4 個/ μ lに調製した。

【0182】このようにして得られた食食サンプルを、それぞれSA食食サンプル、SE食食サンプル、PA食食サンプル、EF食食サンプル、EK食食サンプルとした。

【0183】(iii) 塗抹固定

(i)で得たU937細胞と、(ii)で調製した各細菌食食サンプルを、APSコートスライドガラスの各ウェルに5 μ lずつ塗抹し、風乾させた。

【0184】次に、実施例4(2)に記載のカルノア固定液にスライドガラスを20分間浸した後、75%エタノール

に5分間浸し、カルノア固定液を洗浄して風乾させた後、試験に使用するまで4℃で保存した(実施例4(2)参照)。次いで、固定サンプルの前処理を、実施例4(3)に記載の手順に従って行った。

【0185】(2) 食食サンプルの規格及び試験方法

(i) 細胞数

各細菌食食サンプルのスライドグラスに塗抹固定する細胞数を、約 5.0×10^4 ～約 2.5×10^5 個/ウェルとし、また、U937細胞の細胞数を、約 5.0×10^4 ～約 1.0×10^5 個/ウェルとした。

$$\text{食食率}(\%) = [(\text{陽性細胞数} / \text{計測細胞数}) \times 100]$$

【0189】この時に算出した各細菌食食サンプルの食食率(%)は、10%以上であった。

【0190】(3) 試験方法

実施例10(1)および(2)に記載の方法で調製した食食サンプルを検体とした。

【0191】使用したSA食食サンプルの食食率は23%であり、約 1.98×10^5 個/ウェルであった。SE食食サンプルの食食率は27%であり、約 1.74×10^5 個/ウェルであった。

【0192】また、EF食食サンプルの食食率は34%であり、約 6.40×10^4 個/ウェルであった。各食食サンプルを塗抹したスライドグラスを用いて、実施例4(3)に記載の方法に従って酵素前処理を行った。次に、酵素前処理済みのスライドグラスを湿潤箱に置き、各種力価に調製した各酵素溶液1mlを検体塗抹部位に滴下して反応させた。その後、0.2mol/l 塩酸含有PBS、70%エタノールにそれぞれ10分間浸し、風乾させた。このスライドグラスを70mmol/l 水酸化ナトリウム含有PBSに3分間、70%エタノールに10分間浸した後に風乾し、1%ア

【0186】(ii) 食食率

スライドグラスに塗抹固定した細菌食食サンプルをアクリジンオレンジ染色液で染色し、蛍光顕微鏡(×1,000)で無作為に約200個の細胞を計測した。

【0187】計測した細胞の中で、細胞内に細菌を食食している細胞(図11で矢印にて示す、食食に特徴的な形態変化が認められた細胞)を陽性細胞とし、以下の数式に従って食食率を算出した。

【0188】

【数1】

クリジンオレンジ染色液で染色した。その後、蛍光顕微鏡(×1,000)により評価した。

【0193】S. aureusおよびS. epidermidisは、リゾスタフィンで至適力価の検討を行った。E. faecalisは、N-アセチルムラミダーゼとリゾチームの併用で至適力価を検討するため、N-アセチルムラミダーゼを100単位/mlに固定した場合のリゾチーム至適力価の検討と、リゾチームを10,000単位/mlに固定した場合のN-アセチルムラミダーゼ至適力価の検討を行った。判定は、酵素処理により菌体が白血球中に確認されなくなるとき「適」とした。

【0194】(4) 結果

S. aureusの溶菌においては、リゾスタフィンの力価は1単位/mlで十分効果を示すが、S. epidermidisの溶菌には、10単位/ml以上のリゾスタフィン力価が必要であった(表5)。従って、リゾスタフィンの至適力価を、10単位/ml～100単位/mlに設定した。

【0195】

【表5】

S. aureus(SA)、S. epidermidis(SE)に対する
リゾスタフィンの至適酵素処理力価

リゾスタフィン力価 (U/mL)		0	0.1	1	10	100	1,000
SA食食サンプル	I	×	×	○	○	○	○
	II	×	×	○	○	○	○
	III	×	×	○	○	○	○
SE食食サンプル	I	×	×	×	○	○	○
	II	×	×	×	○	○	○
	III	×	×	×	○	○	○

×：不適、○：適。

【0196】また、E. faecalisの溶菌においては、リゾチームの力価を10,000単位/mlで固定したとき、N-アセチルムラミダーゼ力価が10単位/ml以下では溶菌されなかった(表6)。リゾチームについては、N-アセチ

ルムラミダーゼ力価を100単位/mlに固定した場合、リゾチーム力価が1,000単位/ml以下では溶菌されなかった(表6)。従って、N-アセチルムラミダーゼの至適力価は100単位/ml～1,000単位/ml、リゾチームの至適力価

は10,000単位/ml～100,000単位/mlに設定した。また、
シュドモナス・アエルギノーズに対しても、同様の力
価で使用する事ができる。

【0197】

【表6】

E. faecalis (EF) に対するN-アセチルラムミダーゼ およびリゾチームの至適酵素処理力価

N-アセチルラムミダーゼ 力価 (U/mL)		0	1	10	100	1,000	10,000
EF 食食サンプル	I	×	×	×	○	○	○
	II	×	×	×	○	○	○
	III	×	×	×	○	○	○
リゾチーム力価 (U/mL)		0	10	100	1,000	10,000	100,000
EF 食食サンプル	I	×	×	×	×	○	○
	II	×	×	×	×	○	○
	III	×	×	×	×	○	○

×：不適、○：適。

【0198】実施例10(3)で適と判定した一例を、図12に示す。図12において、(a) は酵素処理前の *S. aureus* の食食サンプル、(b) は酵素処理前の *E. faecalis* の食食サンプル、(c) は(a) のサンプルを酵素処理した後、および(d) は(b) のサンプルを酵素処理した後の様子を示している。

【0199】食食サンプルを用いて得られたこれら結果を臨床検体に応用したところ、同様の結果を得ることができた。それ故、本発明の臨床検体の感染症原因微生物同定における上記各酵素の至適力価も同様とした。

【0200】実施例11：至適酵素処理条件（温度）の検討。

各食食サンプルを塗抹したスライドガラスを用いて、実施例10(3)に記載の方法に準じて検討した。ただし、本試験の酵素処理時間を30分、検討温度は、4℃、25℃、37℃、42℃、60℃とし、各酵素力価は、N-アセチルラムミダーゼ（100単位/ml、生化学工業社製）、リゾチーム（10,000単位/ml、生化学工業社製）、リゾスタフィン（10単位/ml、SIGMA社製）とした。

【0201】各酵素は、実施例6に記載の通り、対象と

なる菌に対応したものを使用した。

【0202】使用したSA食食サンプルの食食率は22%であり、約 1.12×10^5 個/ウェルであった。SE食食サンプルの食食率は29%であり、約 1.62×10^5 個/ウェルであった。また、EF食食サンプルの食食率は23%であり、約 1.38×10^5 個/ウェルであった。

【0203】判定は、実施例10(3)に記載の方法に準じて行った。その結果、*S. aureus*は、4℃～60℃の温度範囲において、白血球の菌体は確認されなかった。*S. epidermidis*は、処理温度4℃および25℃では白血球中の菌体が残存していたが、37℃以上では菌体を確認されなかった。また、*E. faecalis*では、処理温度4℃、25℃および60℃で菌体が残存していたが、37℃および42℃では確認されなかった。

【0204】これらのことから、至適酵素処理温度を37℃～42℃に設定した。

【0205】その結果を、表7に示した。

【0206】

【表7】

酵素試薬の至適処理温度

処理温度 (℃)		4	25	37	42	60
SA食食サンプル	I	○	○	○	○	○
	II	○	○	○	○	○
	III	○	○	○	○	○
SE食食サンプル	I	×	×	○	○	○
	II	×	×	○	○	○
	III	×	×	○	○	○
EF食食サンプル	I	×	×	○	○	×
	II	×	×	○	○	×
	III	×	×	○	○	×

×：不適、○：適。

【0207】食食サンプルを用いて得られたこれら結果を臨床検体に応用したところ、同様の結果を得ることができた。それ故、本発明の臨床検体の感染症原因微生物同定における酵素処理の至適温度も同様とした。

【0208】実施例12：至適酵素処理条件（時間）の検討。

実施例10(1)および(2)に記載の方法で作成した食食サンプルを検体とした。

【0209】検討した時間は、0分、10分、20分、30分、60分、120分とした。

【0210】各酵素は、実施例6に記載の通り、対象となる菌に対応したものを使用した。

【0211】使用したSA食食サンプルの食食率は18%であり、約 7.80×10^4 個/ウェルであった。SE食食サンプルの食食率は34%であり、約 1.10×10^5 個/ウェルであった。また、EF食食サンプルの食食率は28%であり、約 1.30×10^5 個/ウェルであった。

【0212】各食食サンプルを塗抹したスライドグラスを用いて、実施例10(3)に記載の方法に準じて検討した。ただし、本試験の酵素処理温度は37℃、各酵素力価はN-アセチルムラミダーゼ（100単位/ml）、リゾチーム（10,000単位/ml）、リゾスタフィン（10単位/ml）とした。

【0213】判定は、実施例10(3)に記載の方法に準じて行った。その結果、S. aureus、S. epidermidis、E. faecalis食食サンプルのいずれもが、酵素処理時間20分以上（0分および10分においては不適であった）で、白血球中に菌体は確認されなかったことから、少なくとも15分以上、好ましくは20分以上、さらに至適酵素処理時間を30分～60分とするのが好ましい、ことが明らかとなった。その結果を、表8に示した。

【0214】

【表8】

酵素試薬の至適処理時間

酵素処理時間 (分)		0	10	20	30	60	120
SA食食サンプル	I	×	×	○	○	○	○
	II	×	×	○	○	○	○
	III	×	×	○	○	○	○
SE食食サンプル	I	×	×	○	○	○	○
	II	×	×	○	○	○	○
	III	×	×	○	○	○	○
EF食食サンプル	I	×	×	○	○	○	○
	II	×	×	○	○	○	○
	III	×	×	○	○	○	○

×：不適、○：適。

【0215】食食サンプルを用いて得られたこれら結果を臨床検体に応用したところ、同一の結果を得ることができた。それ故、本発明の臨床検体の感染症原因微生物同定における酵素処理の至適時間も同一とした。

【0216】実施例13：プローブ濃度の検討

本発明のin situハイブリダイゼーション反応において、プローブ濃度は、ハイブリッド形成速度に影響を与える主要な因子である。プローブ濃度が低すぎると反応速度の低下を招き、シグナルが明確でなくなる可能性がある。また、過剰量のプローブの使用は、非特異的反応を招きかねない。それ故、各種プローブ液について、至適濃度を検討した。

【0217】まず、実施例10(1)および(2)に記載の方法で調製した食食サンプルを検体とした。使用したSA食食サンプルの食食率は24%であり、約 1.48×10^5 個/ウェルであった。SE食食サンプルの食食率は28%であり、約 2.07×10^5 個/ウェルであった。PA食食サンプルの食食率は18%であり、約 1.50×10^5 個/ウェルであった。また、EF食食サンプルの食食率は24%であり、約 1.72×10^5 個/ウェルであった。EK食食サンプルの食食率は12%であり、約 1.63×10^5 個/ウェルであった。

【0218】各食食サンプルを塗抹したスライドグラスを用いて、実施例10(3)に記載の方法に準じて検討した。プローブとして、ジゴキシゲニン標識したものを使用し、S. aureus (SA-24、SA-36、SA-77の混合物)、S. epidermidis (SE-3、SE-22、SE-32の混合物)、E. faecalis (EF-1、EF-7、EF-27の混合物)、P. aeruginosa (PA-2-31、PA-13-3の混合物)、E. coli (EC-24、ET-49、KI-50の混合物) に対する各プローブ濃度を、それぞれ $0.04\text{ng}/\mu\text{l}$ 、 $0.4\text{ng}/\mu\text{l}$ 、 $1.2\text{ng}/\mu\text{l}$ 、 $1.8\text{ng}/\mu\text{l}$ 、 $2.4\text{ng}/\mu\text{l}$ 、 $3\text{ng}/\mu\text{l}$ に調製した(特許第279849号参照)。

【0219】食食サンプルを塗抹したスライドグラス(図13参照)に、上記の各種濃度に調製したプローブ液を使用し、実施例4(3)～(11)に記載の方法に従って検討した。ただし、使用したプローブは、各菌に対応したものを使用した。また、実施例10(4)に示した力価の酵素を3種類混合して用いた。

【0220】その結果、低濃度($0.04\text{ng}/\mu\text{l}$)ではシグナルが明確でなくなり、高濃度($2.4\text{ng}/\mu\text{l}$ および $3\text{ng}/\mu\text{l}$)ではバックグラウンドの増大が認められた。それ故、SA、SE、PA、EF、EKのプローブ濃度を、 $0.4 \sim 1.8\text{ng}/\mu\text{l}$ 、好ましくは $0.4 \sim 1.2\text{ng}/\mu\text{l}$ とした。また、 $0.04\text{ng}/\mu\text{l}$ においては「不適」であり、 $0.4\text{ng}/\mu\text{l}$ においては「適」であったことから、少なくとも $0.1\text{ng}/\mu\text{l}$ 以上とするのが好ましい。さらに、 $2.4\text{ng}/\mu\text{l}$ では「不適」であり、 $1.8\text{ng}/\mu\text{l}$ では「適」であったことから、 $2.2\text{ng}/\mu\text{l}$ 以下の濃度とすることが、好ましいことが明らかとなった。

【0221】食食サンプルを用いて得られたこれら結果を臨床検体に応用したところ、同様の結果を得ることができた。このことから、本発明の臨床検体の感染症原因微生物同定における上記各プローブの至適濃度も同様とした。

【0222】実施例14：ハイブリダイゼーション温度の検討

ハイブリダイゼーション反応における反応温度は、ハイブリッド形成速度とハイブリッドの安定性に影響を与えるパラメーターである。ハイブリダイゼーション反応を高温で行うと、細胞の形態が劣化することが知られていることから、至適温度の検討(4°C 、 25°C 、 37°C 、 42°C 、 50°C 、 60°C)を行った。

【0223】まず、実施例10(1)および(2)に記載の方法で作成した食食サンプルを検体とした。使用したSA食

食サンプルの食食率は31%であり、約 1.38×10^5 個/ウェルであった。SE食食サンプルの食食率は42%であり、約 1.95×10^5 個/ウェルであった。PA食食サンプルの食食率は15%であり、約 1.30×10^5 個/ウェルであった。また、EF食食サンプルの食食率は48%であり、約 1.05×10^5 個/ウェルであった。EK食食サンプルの食食率は17%であり、約 1.85×10^5 個/ウェルであった。食食サンプルおよびU937細胞を塗抹固定したスライドグラス(図14を参照)を使用して、実施例4(3)~(11)に記載の方法に従い検討した。ただし、使用したプローブは、対象となる菌に対応したものを使用した(実施例13を参照)。また、実施例10(4)に示した力価の酵素を、3種類混合して用いた。

【0224】その結果、ハイブリダイゼーション温度が4℃以下では、ハイブリッド形成速度が低下し、各種プローブで安定なシグナルが観察されなかった。また、60℃においては細胞形態の変化が認められ、安定なシグナルが観察されなかった。

【0225】また、25℃および50℃では、37℃および42℃に比べ、シグナルが明確でなかったが検出することは可能であった。従って、至適ハイブリダイゼーションの温度は、25℃~50℃、より好ましくは37~42℃に設定するとよい。

【0226】食食サンプルを用いて得られたこれら結果を臨床検体に応用したところ、同様の結果を得ることができた。それ故、本発明の臨床検体の感染症原因微生物同定におけるハイブリダイゼーションの至適温度も同様とした。

【0227】実施例15：ハイブリダイゼーション時間の検討
実施例10(1)および(2)に記載の方法で調製した食食サンプルを検体とし、10分、60分、90分、120分、180分、900分間のハイブリダイゼーション時間について検討した。

【0228】使用したSA食食サンプルの食食率は47%であり、約 1.45×10^5 個/ウェルであった。SE食食サンプルの食食率は47%であり、約 1.33×10^5 個/ウェルであった。PA食食サンプルの食食率は17%であり、約 1.95×10^5 個/ウェルであった。また、EF食食サンプルの食食率は41%であり、約 1.45×10^5 個/ウェルであった。EK食食サンプルの食食率は20%であり、約 1.23×10^5 個/ウェルであった。

【0229】食食サンプルおよびU937細胞を塗抹固定したスライドグラス(図14に示すものに同じ)を使用して、実施例4(3)~(11)に記載の方法に従って検討を行った。

【0230】ただし、使用したプローブは、各菌に対応したものを使用した(実施例13参照)。また、実施例10(4)に示した力価の酵素を、3種類混合して用いた。

【0231】その結果、ハイブリダイゼーション時間が

10分ではシグナルが観察されなかったが、60分以上でシグナルが観察され、90分以上で安定したシグナルが観察された。また、ハイブリダイゼーション時間を900分としても、シグナルの検出には変化は認められなかった。従って、少なくとも30分以上、好ましくは60分以上、より好ましくは90以上とするのが好ましい。さらに、至適ハイブリダイゼーション時間として、120分~900分の時間を設定するのが好ましい。

【0232】食食サンプルを用いて得られたこれら結果を臨床検体に応用したところ、同様の結果を得ることができた。従って、本発明の臨床検体の感染症原因微生物同定におけるハイブリダイゼーションの至適時間も同様とした。

【0233】実施例16：ハイブリダイゼーション溶液に添加する界面活性剤の影響
実施例10(1)および(2)に記載の方法で作成した食食サンプルを検体とした。

【0234】食食率は17.5%であり、約 1.90×10^5 個/ウェルであった。また、実施例10(4)に示した力価の酵素を3種類混合して用いた。プローブ(PA-2-31およびPA-13-3)希釈液に各種界面活性剤(SDS、ラウリスサルコシン、サポニン、BRIJ35、Tween 20、Triton X-100)を添加し、実施例4(7)の記載に従ってハイブリダイゼーションを行ったところ、0.25%のSDSを添加することにより検出感度が飛躍的に増強した。また、ラウリルサルコシン、BRIJ 35、ツイーン20(Tween 20)によって検出感度を高めることができた。

【0235】その一例を、図15に示す。図15(a)は、界面活性剤としてSDSを用い、プローブPA-2-31およびPA-13-3を用いた結果であり、図15(b)は、SDSを用いなかったときの結果である。

【0236】さらに、SDSを種々の濃度で用いた結果、好ましい濃度は、1%以下、より好ましくは0.1%~0.5%、さらに好ましくは0.25%であることが明らかになった。

【0237】食食サンプルを用いて得られたこれら結果を臨床検体に応用したところ、同様の結果を得ることができた。ゆえに、臨床検体においてもin situハイブリダイゼーションの工程に界面活性剤、特に、SDSを添加するのが好ましい。

【0238】実施例17：ハイブリダイゼーションの際に使用するプローブ鎖長の検討
Pseudomonas aeruginosa プローブ(PA-13-3、配列番号：6)を用いて、ジゴキシゲニンにてラベル化を行った。

【0239】まず、精製したDNAプローブ1μgを、10×L.B.(0.5mol/l トリス塩酸(pH 7.5) 5μl、50mmol/l 塩化マグネシウム、0.5mgウシ血清アルブミン) 5μl、100mmol/l ジチオスレイトール 5μl、dNTPs (A、G、C) 各1nmol、ジゴキシゲニン-dUTP (Dig-dUTP)

0.5nmol、dTTP各0.5nmol、DNase 3 μ l (20mU、40mUおよび60mU相当量)、10 U/ μ l DNAポリメラーゼ1 μ lを含み、適量の滅菌精製水で全量を50 μ lとなるように調製した。15℃、2時間でジゴキシゲニンラベル化を行った。ラベル化した後、5分間煮沸して反応を停止させた。反応停止液をスピナラム (CENTRI-SEP COLUMNS CS901, PRINCETON SEPARATIONS, INC.) に注入し、25℃で2分間遠心分離 (3,000×g) を行い、遊離しているヌクレオチドを除去した。

【0240】そして、溶出液の濃度を吸光度計により測定し、3%アガロースゲルにて電気泳動してサイズを確認した。次に、サザンブロッティング法によりアガロースゲル中のDNAをニトロセルロース膜に転写させた。

その後、2%ブロッッキング試薬 (ロシュ社製) に30分間浸した後、1/5,000量のアルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を加えて30分間浸した。次に、100mmol/lのトリス塩酸 (pH 7.5)、150mmol/l塩化ナトリウムにて10分間振とうし、2回洗浄した。そして、100mmol/lのトリス塩酸 (pH 9.5)、150mmol/l塩化ナトリウムにて10分間振とうして洗浄した。その後、前出のNBT/BCIP溶液に浸して発色させた。最後に、精製水に浸し、発色を止めて乾燥させた。

【0241】その結果を、図16に示す。図16から明らかなように、20mUのDNase (図16(a)のレーン1) を用いて、主として約350~600塩基長に分布するように切断した場合に、ラベル効率が高いことが示された。こうして得られた検出用プローブを、食食サンプルや感染症患者からの臨床検体を用いた本発明の感染症原因微生物の検出方法において使用し、ハイブリダイゼーションを行ったところ、優れた感度でシグナルが検出された。従って、効率よく *Pseudomonas aeruginosa* 菌を検出する上で、ハイブリダイゼーションに使用するプローブの鎖長としては、約350~600塩基長、好ましくは350~550塩基

長、そして、最も好ましくは350~500塩基長が良いことが判明した。

【0242】実施例18: ハイブリダイゼーションの際に、使用するプローブの検討。

実施例10(1)および(2)に記載の方法で作成した、PA食食サンプルを検体として、検出用プローブについての検討を行った。

【0243】検出用プローブとして、PA-2-31、PA-3-12、PA-4-15、PA-13-3を用い、実施例17の記載に従ってジゴキシゲニンラベル化し、約350~600塩基長を有するように調製したものを、それぞれ単独で、界面活性剤非存在下でのハイブリダイゼーションに供した。そうしたところ、各プローブを単独で使用しても、シュードモナス・アエルギノーザ菌を検出することができた。

一方、PA-2-31とPA-13-3を混合した方が、それら単独で使用した場合よりも、シグナルが明瞭に検出され、検出感度が高められた。

【0244】他のプローブの組み合わせまたは3種以上のプローブの組み合わせにおいても、同様のことが判明している。

【0245】

【発明の効果】このように、本発明の検出用プローブによれば、それをin situハイブリダイゼーションに適用することで、2時間以下という短時間の内に、検出対象菌に対して安定なシグナルを発現することができるため、迅速かつ的確な検査結果をもたらすことが可能となる。

【0246】また、これにより、シュードモナス・アエルギノーザ菌のみならず、敗血症や菌血症などの疾患に対する診断材料を医療現場に迅速に提供でき、人命救助の観点からも多大な貢献が期待されるものである。

【0247】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.
 <120> Probe for Detecting *Pseudomonas aeruginosa* and Methods using the same
 <130> 2001PA0132
 <160> 6
 <210> 1
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 1
 cgacgttgta aaacgacggc cagt
 <210> 2
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 2

caggaaacag ctatgac

17

<210> 3

<211> 2056

<212> DNA

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 3

```

aagcttggcc tggcactggg acgagggcag cagacgcaac aaaagccgcg agaagcgtgg      60
acttgcaact tatgccgagc agctcgaagc gctgcgcat aagcgtatcg tcttcatctt      120
tgacgaatgc caccgttcgc aattcggcga taaccatcag gccattaaga cgttcttccc      180
caaggcccag ctttttggct ttaccggcac gccaatcttc gaggccaatg ccagcattaa      240
gcagatcagt ggcgaaagaga agacgctaaa gaccacgcag gatttgttcc agcaatgtct      300
gcacgaatac accattagcg atgccatcga cgatcgcaat gttttgaagt tccacgtcga      360
ctactacaaa cccgacggga aagaaccaac caaaccgggt gaaaccctgg ccaagcgcgc      420
cgtcgttgac gccatcctcg ccaaagcaag atgccgctac gggggggcgc aagttcaacg      480
cgattctggg cacagcttcc atcaatgatg ccatcgcta tcacgacta tttgaagagg      540
ctcaggccga gaaactgcag gccaaacccg agtttgtgcc gctaaatac gccgccgtgt      600
tctctccgcc gggcgacgtg agcgccgatg tacgtcagtt gcaggaagac ctgcccaccg      660
agctggaaga caaccagcag gagacggacg ccaagaaggc ggcgctgcaa gcgatcattg      720
cccgtataa cgcccgttc gatacgaacc accgcattga ggaattcgac ctctactacc      780
aggacgtgca gcagcgcatc aaggatcagc aatggccgga tgccgacctg cgcaaagcca      840
accccagggc cccgcaacac aagatcgaca tcaccatcgt cgtcgacatg ctgctcaccg      900
gcttcgacag caagtacctc aacacgcttt acgtcgacaa gaatctcaa caccacggcc      960
ttattcaggc cttcagccgt accaaccgcg tgctgaatga tacciaagccc tttggccata     1020
tcctcgactt ccgtgggcag caagacgcgg tggacgctgc catcgcgctt ttctccggcg     1080
cgaaggccga tgaggcgcgc acaatctggt tggtagacaa agcccctgcg gttatcgaaa     1140
agctccaaga agccgcactc ggctgcaca gcttcatgga ggcatacggg ctttcaggca     1200
aaccgagga gattgccacg ctcaaggcgc acgaagccc gacggtctt gtcgaagcct     1260
tcaagaaggt gcagaagctg caaaccagc tcgaccagta caccgacctt acccccagc     1320
aggaagcctc tatccaggcc atcctgccgc cggacgaact caacgccttc cgtggccagt     1380
acctggagac ggccagacgc ctgcgcgacg agcgagccca agcctggcga tgccaagcgc     1440
gaggaaactg agcagctcga ttctgagttc gtgtcttctg cttccgccac catcgattac     1500
gactacatca tgagactgat cgccgatttc tccaccaaga agcctggcaa agccaccatg     1560
agccgcgaac agttggccag cctgatcgcg agcgacgcca aattcatcga cgagcgcatg     1620
gacatcaccg aatacgtgat gaggctcaag gccggcgagg gcctggacga acgcgccatt     1680
cgcatgggct accagcaatt caaggcggtg aaagcctccc gcgaactgac cgagctagcg     1740
gccaaagcag gactgccacg tgcagacta caaagtttta tggatgaggt actggagcgc     1800
cgcatcttcg acggcgaaca gctaaccgaa ttgctcgccc cgctggaact gggttggaaag     1860
gcgcgtacgc agaaggaatt ggcttgatg agcgagctgg caccgatgct gaagaagcga     1920
gccggcgccc gggatatctc aggcctccag gcgtatgagg attgatcaat ggtgaaggcg     1980
ggcaataaag cgatggtacc tcggttgccg tttcccgag tttcaacacg agggagactg     2040
gacgacagta aagctt

```

2056

<210> 4

<211> 5324

<212> DNA

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 4

```

aagcttgccg cgatcgccca cctggccgcc ggcgtcgccc atgagatcaa taacccatc      60
agctacgttt cctccaacta caccaccctg gaggagcacg tcaggcgctt gctggaggta     120
cttgaagcct atgaagagcg tcgccccgcg atccgcgacg aggcgctggc aagacgcctg     180

```

gagcagctcg gcgagcgggt cgaactggcc ttcgtcaagg aggatgtcgc cgtgttctg 240
 cgcaatcca gggaaggtat agggcgggtg cgcaagatcg tccaggacct gaagaacttc 300
 tcccgcgtcg acgccgagga cgactggcag tggaccgatc tgcaccaggg gatcagtcg 360
 accctcaata tcgtcgccag cgaactgaag taccgggccc acgtgggtccg cgaatacggc 420
 gatctacccc aggtgaagtg cctgccgtcg cagatcaacc agtgtgtgat gaacctggtg 480
 atgaacgcgg cccaggcgat ggggccggag cggggtcgca tcgtattcg cacggggcat 540
 accgtggagc atgcctggat cgaagtggaa gactcggggc agggatatctc ccccgagatc 600
 ctgccgcgca tcttcgatcc gttcttcacc accaagccgg taggcaaggg gaccggcctg 660
 gggttgcgc tctctacgg catcgtccag aaacacggcg gcaccatcga ggtacgcagc 720
 cagccgggag tcggaagcgc tttccggatc gtgcttcccc tggaatcacc cggaacctg 780
 ggcggagccc acggaaatta actgttcgcg cggctagagt aacgtaagac aatgatttat 840
 ctaccgtttg gggtgggtct cgggttggga tgcgggtttg gttcccgttg ccggtcact 900
 tgaagcgaga tcctgcccg atggcgaaat cggtagacgc aagggactta aaatccctcg 960
 ggggtaacce cgtgccgtt cgacccggc tccgggcacc atcgtgtttc ctggcgttca 1020
 gccgacttct ggttcttcc cccgattttc ttcggcccg ccatcgcgcg gcaatcaacg 1080
 agtcgacgtt gccttcttcc cctcctcgcc cttggaggcg tttcattcta gtacggtccc 1140
 gtatagggtt cgccctggct ggtgtcggg agtgtttgtg cagcttgaag tagttgtctt 1200
 tggaagtttg atttttgtc gttatcttct gctcctgctt ttaatttcc tttccgaata 1260
 tattcaattc actggcgga ttatcctctt ttctcctgca tgaattgta ggcggacttt 1320
 cctcgttctg gtgtttgtg gacagggaag gatcggaat cagggttttt cgctctttc 1380
 gttttgaac aggaattcat atatcgga tcaatcatgg cttggaaagg tgaggttctg 1440
 gctaataacg aagcagggca ggtaacgtc attatctaca atccggcgca tgtcattacc 1500
 atcgtcgccg ccggttgggc cagttacgga cctaccaga aatgggggcc gcaggcgat 1560
 cgggagcatc cggaccaagg gctgatctgc cagatgcgt tttgtgtgc gctggtcatg 1620
 aagattggca acagcggaac cattccgtc aataccgggt tgttccgttg ggttgacccc 1680
 aataatgtcc aggtgcaat cactcttacc tacaacgacg tgcccgaac ctatggcaat 1740
 aactccggtc cgttcagtgt caatattgga aaggatcagt cctgataact tgtctcgga 1800
 aaaaaagggc ccgaatgggc tctttttta aatgcaata aagtgaagt gcccgtgtg 1860
 ccgttatgaa cggacaggca gcgcttcgca gttcgacta ccaatgaca gagtatcga 1920
 ctcttgagc tgcgcggtc gtgggaaacc gagcgagtgg gggcggggaa ctgcttcaac 1980
 acgcttcggc ctgaacggga atatcgattc ctgaccgat tcagaattcc gtccacatag 2040
 tagacagtac cgaagccgat gccctgcga ctttccctgg ttgtatttcc cgctctcttc 2100
 tccattgccg ctggcggcg ggaggaactc aaggacatgg caggttcgac catcgtcgtt 2160
 gccggaagac tcgagccgt cgaatgccct ggcgcaggcc tgtacgattg cacggsgtgg 2220
 cctgccaacc tgtaccgtt cgaggacag gacgtgtgcc tcagcatcga ggctggctgc 2280
 gattacagtt gcgatgcat tctcagcgag aaggcgcgca cgcaatcgat cctggtttcc 2340
 ggctcctatc gcgatcacat ccgaagggt gaaggcacgc aggtctctg cccgcgctag 2400
 agacgctcgg ccgagcgtg gaaacatcg gagtgcaac ggacggtctg ccgccgctg 2460
 aagaaggcga gcggcgcggt atgtgctagg gtgccggtt gcagggagga cccagggcatt 2520
 ggagcaccca tacaagacc caggcgga cctggccgag gagaagctga ctgcgagagg 2580
 tttcctttcc ggcgggcagc cgtgtggaa ggcattctgg ctgttcttc ctgcgggttt 2640
 cttattgctc agcgtcgcc ccaggcaggc gatgttgcc attgtcgatc cgtgatgca 2700
 ggaagctccc ggcgaacat cgttgccct gacctgtgg ggaatggctg gtgtcgagct 2760
 ggttaggctg gcctacctg gcctcagct cgtcgtgtg tggcgtgcg ggcgaattc 2820
 ccgctgggtg gctcgcgcc atgccagcg ggcgtgtgt ttggcactga tactcctgac 2880
 cctttactcg atctatctg tctgggcctt gctcgccagt ccctgagcga cgcgtgagg 2940
 ctggcgagca tctgtgtagg gccatttcca cgtccctgca ttggctaacg ccgcagccag 3000
 tctccagtt gctccggcag catcggttg gcgatcagat agccctggcc ctctgtgcag 3060
 cccaggcct gcagcagtg gaaggtgtg tgggtctga tgccttcgc gaccaccga 3120
 taaccaact ggctggccag gccgatcacc gcctgggtga cgctctgcgc cttcggcgag 3180

```

ccggcgaggt cgcgggtgaa cgattggtcg agcttgatgg cggatgattgg cagatcgcg 3240
aggttagtcc agttgctgta gccgggtgcc aagtcgtcca ccgcgatgcc catgccaaagc 3300
tcccgggcac gcagcagcac cgagccgacc gccgaggcgt cgcgatgag tacgcttctg 3360
gtgaattcca gctcgagggc ggaaggtcg atgtcgtagg tttggcgag tctgacggcc 3420
tcttccagga agctgctgtc ttccatgtcc gatgccgata cgttgatcgc cagcctgagc 3480
gggatgttcc gtgcgttcca ttgcgccagc tgggccatgg catggcgag caccagtcg 3540
ctgagggggc gcatcagtcg ggttttctcc gccaggggca cgaattcggc ggggctgacg 3600
aagccgagtt gcgggtgccg ccagcgcagc agcgttcca cggcgtgca cctgcctgtc 3660
ggcaggtcga ttttcggctg atacaccaga tggaagcctt cttcggttcc gatcgctgg 3720
gacagcgagg tcagcaatgt gaagcacgc tgctgggcct ggtccagcgg cgggttttag 3780
cgggcccagc cgacaccgcg gtcgcgggcg tcgtcgccg cgctgaccac caggcgagc 3840
cagtcctgat cgccgtcgag gggatcgctg gcaagcggtg gtacgccgag gccacgttg 3900
gccttgatcg ggatcccgcg acatacgacg gggttttga aggcccgag caggcgagg 3960
cagaccgact cggtttcttc ctgttctgc cgtggcagga gcagtcgaa gcgcgtcggg 4020
ctgatcttgt agagagtga atccggcagt tccgcgcgga tgcggtcgcg cgctcgagc 4080
atgaggtcgt tgaaaagg atagcccagc gtacggatga tggatttcag caggcgagg 4140
ggcaggaggt cggcgcgcat caggtgagg gcgccgtcgc gtcgagcg caggaaacg 4200
tcctcctgca ggcgagacg gttgtacagg ccggttggt cgtcgatgta gttggtcgag 4260
cggagcgtat ggatacggc catcaccagc cggcggaagt gtcgagcat ggcgacgtc 4320
cgctcgcca gcggcccgcg tggttcccgg tcgatgacgc agagctgcc gagttgaga 4380
ccttcccgcg tggccagcgg agccccgcg tagaagcgga tgcgcggttc gccttgaca 4440
taggggttgt cccggaagcg cgggtcagg gtggcgtcgg ccacctgaa tactccttg 4500
cccaggatcg cataggcgca gaacgaatcc cgtcgcgcg tctgccgat atcgaggccg 4560
atgctcgcgc gaaaccactg gcgtgatgg tcgaggatgg aaatgagcg gatggcgctc 4620
tggaagtagg acgtagcggc ggcgaggatt tcctcgaata cctcgtccg accttcttc 4680
agcagaccga gttggtcgac gtaggcctgt ctgcaatgt cgtcctcgg atagggtggg 4740
gttgccatgc tggactcctt ggggctactc cgatgtcgg catcgcaat caatgatgtc 4800
attgtgcctt tatttctg agcgcgggct cttttcccag attgcagcga tgaaaggcg 4860
tgaggttga tcgcggtcat gccgtacgg ccttcgacgc cgacgccagc tctcgaaat 4920
cgattacctg gtaaacggac tcttctata tcggccagca tcaccgctc gtaaacggt 4980
cgcacatgct tccaccgaga aaagacatgt ccgacacgt ctccttcgcc tcgcgectc 5040
gcaagtctgt catccttctc gtcatcctgc tgatcgcgcg cgccagcctc ttcctgtgt 5100
ggctggggcg accttaccg gacgccatgt ccgccttct cccgttgctc atgccgatgc 5160
tgtttctggt gctggcgttc gacaccttc gcgccttct cggccccgg cgctagacct 5220
ccggcgcgcg aggcaccgat gcagcgtgt atccccgtc tggccctgtc agcactgata 5280
cgtggagagt ctttcaggc cagccactga cccgaggaa gctt 5324

```

<210> 5

<211> 2096

<212> DNA

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 5

```

aagctttccg cgcagcgct ggaacgtctc gaacgtacc actggccgg caacgtcgg 60
caattgaaa acgtgctgtt ccaggcggtt tcgtgtgcg aagggggaac ggtcaaggcc 120
gagcacatcc gcctgccgga ctacggcgcg ccgcagccgc tgggggattt ttccctggaa 180
ggagacctcg acgccatcgt cggcgcttc gagaaggcgg tgctggagcg cctgttccgc 240
gaacatccga gcagccgcca gttgggcaag gcctcggcg tttcgatac cagggcgcg 300
aacaagctgc gccagcatgg cgtggggcaa gscgagggt gagcgcatg cttgccggtt 360
tgttgagcg tgggaaagaa acggtggagg cgtcgccct tgtgaaagg cggcagcacg 420
atgaggcgtg gggaaagcgg caggatgtt gccaggggc gggattgtc ccgccagta 480
cacaatgatc gcgccgatg ggcgagctc cctcgtggc gcgatcctt ggaggtcgag 540

```

cagagtttag ccgccagtgc agccgttgcc ccagacctga tattcgacgg tatgtttctg 600
 gccgttcgaa tcttcgtagg tcatcgctgc gggaacgatg ccgcaggcat tggaagtgtc 660
 gggtgaagat ataacgcgag ccacatccag ttgcatgcca taggcatatt cttcaacagc 720
 gttttcctgc tggctggcag gttgacctg ggcgccagcc gccatcacca gcggcgagca 780
 ggcaaacagg gccatcaggg cgaaagcctt cattactatt tacctgagta gtttctgagt 840
 gggtagcgtc tgcgctcgga agacaggcgg acaggtcacc ggggcaactc gataaacaag 900
 gctgggtaag taagtctgca atcaagttgc ggagtcgaag ttcaacggga gtttaacttcg 960
 gctgttgggt ttattgtaag ttgggatagg ctgcgacata tagactcagt caagacaaga 1020
 acctgttacg gatcggtaac aatatccctg tggccttctg cgccgcggct ttgcgaccgg 1080
 ctcacgggtt tctttcctgg ccagggggcg attgcgggtc gagcaggggcg ctgcgaatga 1140
 agtcaggta gctgagcacc cgctgcagcg gcgaggatc gaactgcggg gcgcgcggct 1200
 ccggcgccgc ccgtaccgcc atgacgcct ggttcaccgc gtgcaggcg cgctggcggt 1260
 tgctcgcccc gggttcagg aacagccgga tcagcgcccc gccatcagg cggtatcccc 1320
 ggcccgaggc ggtgcgttcg gcgtagcagg gctcctgggg caggcgttgc tgttcgaggc 1380
 gcagctcaat gatcgcttg ccgacctca gcaccaggaa catccagccc agcaaccggc 1440
 gttgcacgtc cggcgccgcg gcggagaagg ttaggcctg gttcagcagg tcgcgggtgc 1500
 cgctttcgaa accggagacc aggccttgc tcttgccgct gatggcgaac accaccgct 1560
 cgcgagggtc gtgctccagg cgctccaca tccacggccg gttcgccggc aggtacacca 1620
 tggcgccgac cgtggcgagg accatcgaca agagtagtgc caggatattc ttgaagaagg 1680
 cccaggggtc gtagcgccc atgttgcgg gcagcgaggc gaagcagaac cacaccagta 1740
 ggccgacgcc gtagccgttc cactcgggcc gccagagcag caggcgccg accgcaaga 1800
 ccggcagcag gcagcagagc agcatcgga aaccgtccac gtggggtagc aggtagagca 1860
 gcacgaacag cccgatgcag gcccggcgga ggtcccag ggtgagttgc agcgacaacc 1920
 ggccgggatt cggcgaggtc gaggagagcg ccgagatcag taccgcggtg agggcgagg 1980
 tgccgccgtg gggccaggag gtctggatcc agaacgtgcc gagcaggccg atcatcagcg 2040
 cgctgcgcgc tccggcgacc agcgcgcgga ccgggttggc gcggcgacg aagctt 2096

<210> 6

<211> 4663

<212> DNA

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 6

aagcttgggg ctgttcgac gattagcaca gaaaaagtgc gcaataacat ttgcgtccg 60
 atgagcatca catccggcgt ggggcttcta agtcaagagg acaagtttgg ccgtgtaatc 120
 gctggcgact catacaaaag ctacttgctc ttgaagccaa acgattttgc ttacaacaag 180
 agcgctacca aggaatttcc tgaaggtttt ctactctgt actcgggtac ggagctggct 240
 gcggttccga acagtatatt cacttgcttt cggatcaacg gcgcgtcgcc aaatacgcgg 300
 tttctgaact atcaattctc agacaacctg caggggcgtt ggctgcgcaa gttcattcag 360
 gttggggctc gggcgcatgg ttcgttgagt gtcagtgatg gcgacttgct ggcgctgccc 420
 attcccgttc cggcgggcac aacatcggtc gcagaacaac aaaaaatcgc cgactgcctc 480
 acctctctgg acgagctgat tacagcgag gagcgaaaag tcgaggcatt aaagacttac 540
 aagcgcgccc tgatgcagca gctcttccc cgcgaaagggtg aaacccttcc ccgtatccgc 600
 tttcccgagt tccgtggtgc gccagagtgg caagccaagc cattaggaga gcttgtgcaa 660
 ctgcagctctg gatttgcatt ctcaagcagt ttcttctcgg actcaggcca gaagttggtg 720
 accccaaaga actttacaaa gacgggtttc ggaaattttg agagttcgat ctcgaaatat 780
 acaacagagg aagtgacaga aaaataccag tctcgcccag gtgatttact tgtgcttctg 840
 acagatttaa ctctacttg cgactttta ggtcaaccga tagaagtac tgaggcgac 900
 ggaaacctgc tactcaatca gcgagtggtg aagattgaac caatatcagc gcgggttaat 960
 aagagtttcc taaagcaatt tctgctaagc gactcttacc gcaaggttat agtaggaact 1020
 gcaaccggga ctaccgttaa gcatagctct aataaggttc tggagggaat agagttcgtt 1080
 ttccctcaag aagaggagca gctctgcatt gctacttgcc tttcctcctt agatgtgcag 1140

atcttcgtcg	aatataaagc	aatcgaacta	ataaaaactc	ataaggcggg	actcgtgcag	1200
cagttgtttc	cgtctcaagg	ggcggtttga	caatggctgt	tatatgtttt	tcagatttgt	1260
cggcactggc	acaatactta	cgtgagaacc	ttgaattaaa	gaagttctcg	cttatttatg	1320
cctacaatgg	gacgggaaaa	acaaggctgt	ctggagaatt	caaggagcag	ggtagaaggt	1380
tcggcgagga	ccgcgagatc	acgcagcgtg	atacgtttta	tttcaatgcg	ttcaccgaag	1440
atctttttta	ctgggataac	gacctcaaaa	acgaccgaaa	gcgagtgtcg	aaaatcaacg	1500
gcgattctcg	tttcttctca	gggctagaaa	cgcaggaaaat	ggataatcgt	atccgcccg	1560
tgctaaaccg	ctacgcagac	tttgactttc	gcatcgacac	caccgagtgg	gaggtgagct	1620
tctcccgaga	agtggagatc	gacggtaaga	ggacaacggg	agaagacatc	aaggtctcac	1680
gtggcgaaga	gaacatcttc	atctggtgtt	tctttctcgc	catagtgcag	ctcgcgctcg	1740
atggtgacga	ggcctacgag	tgggtgaagt	acgtctacat	cgacgatccg	atttcatctc	1800
ttgacgagaa	caatgcgac	gctgtggccc	accacttggc	ccaattactg	atggccaccg	1860
ataaagggcc	gcgcgtggtc	gtgtccacgc	atcatgtact	tttctttaac	gtgctatgca	1920
atgagttcaa	gggcaaggcc	tacaagcatc	tgctgaagag	ggggcgccgc	ctgggtagct	1980
attcgctagt	ggatacctcg	gccaggccct	ttcttcacca	tctatcaaac	ttagttgagc	2040
tgatgacgc	gcaggccagt	ggttcccttt	acaccaccca	cttcaacatg	atgcggcgag	2100
tcatggagca	gaccgcaaat	ttcttggggc	tggacgactg	gaaggcctgc	attgccgcgc	2160
cggatgtgtc	agacaaggca	ctgcacaagc	gcttcattga	tctgatgagc	catggcgact	2220
attcgctcta	tgagcctcgg	gaaatgatgg	aggagaacaa	agcgacttcc	cggattatct	2280
ttcggcagtt	cattaccggg	cacccttcca	atcgcgcact	gtttccgaac	cttttcaata	2340
tagcggcgcc	gaccccgat	gttgacgcat	gagaggactc	atcctctaca	ccactggcga	2400
cgaatgcagc	caggtcaagc	tgcgagccaa	ggatcagccg	gtctggctct	ctcagcgtga	2460
aatggcagag	gtgttcgacg	tcagtaccga	taaagtcagc	ctgcacctga	agaatatctt	2520
tcacgatggc	gagttgagcc	gtgaggcgat	ccccgtgagc	ttctggcgcc	agaacgtgga	2580
ccagatcatc	ggtagcaacg	gttttccgct	gctcaccat	gccggcaagg	tgagctacgc	2640
gcaaatggaa	cgtgccacca	ttgcgtttta	tctcgattat	gaccaacgcc	gcaaacagaa	2700
ggaggcacgt	caggccgacg	cgcaggacga	agctgaaccc	aaggcgctgg	aaaacacact	2760
caagaaacgg	cccaaaccat	gaccgaacaa	gaccagaaac	agctgggcaa	aaccctatgg	2820
gcgattgccg	accaattacg	tggttcgatg	aacgccgacg	attttcgcga	ttacatgctg	2880
tccttcctct	tcctgcgcta	cctctcgac	aactacgaac	aggctgcgaa	gcgggagctg	2940
gggcccgaat	atccggacgt	ggcgccggac	gtgatggagc	agaccgaagc	cacgacaccg	3000
ctgcaaatct	ggtatgaaga	gaacgccagc	gacgtggtgg	cgttcgagaa	gcagatgcgc	3060
cgcaaggtgc	actatgtaat	cgagccagag	tacctatggg	gcaacatcgt	tcaactggcc	3120
aagaccaga	gcgacaagct	gtcgcatacc	ttgcaacggg	gcttcaagta	catcgagaac	3180
gagtccttcc	aaagtaactt	ccaaggattg	ttctcgaaaa	tcaacctcgc	gtccgacaag	3240
ctcggctcga	agtacgagga	tcgcaatgcc	aagctgtgtt	cgatcctctc	ggagctggcg	3300
cgcggcatgt	cgctgttctc	caccgacacc	gacacgttgg	gcgacgctta	tgagtacctg	3360
atcgccaat	tcgccgcagg	ctcgggcaag	aaggcggg	agttttacac	cccgcagcag	3420
gtctcgaaca	ttctttcggc	catcgtcacg	ctcgacggcc	aggcgcccca	gaccggtttc	3480
cgcaaaaagc	tggaaagcgt	gttcgacttc	gcctgtggct	cgggctcgct	gctgctgaac	3540
atccggcacc	gcatgaagga	cgcgggtggt	agcatcgcca	agatttacgg	gcaggaatac	3600
aacatcacta	cctacaacct	ggcgcgcatg	aacatgttgc	tgacgggggt	gaaggacacc	3660
gagttcgaga	tttaccacgg	cgacacgctg	accaatgcct	gggacttctc	gcgcgagacc	3720
aatccggcga	agaaaccgca	gtttgacgcg	gtggtggcca	atccgccgtt	cagctatcgc	3780
tgggatccga	gcgatgccat	cagcgaagac	atcgcttcca	agaaccacgg	cgtggcaccc	3840
aagagtgcgg	cggacttcgc	cttctgctg	cacgggctgc	actacctcaa	agacgatggc	3900
gtgatggcca	tcacctgcc	gcacggcgtg	ctgttccggg	gtggtgcgga	agagcgtatt	3960
cgccgcaaac	tgtgcagga	tggacacatc	gataccgtga	tcgggctgcc	ggccaatctg	4020
ttttattcaa	caggcatccc	ggtttgtatt	ctcgtgctga	agaagtgcga	aagatcgac	4080
gatgtgctgt	ttatcaacgc	ggccgagcac	ttcgagaagg	gtaggaggca	gaaccagcta	4140

```

gcagaccgac atactgacaa gattatcgag acctacgagc aacgcccagc ggaagtaccg 4200
cgctatgcgc gacgggtaag catgcaggag atcgagaaga acgacttta cctgaatatc 4260
tcgcgctacg tcagcacggc ggtggccgat gaagaaatag acctgacggc cgtgcatgcc 4320
gagcttgtgg cactggatca gaggatcaag acggccaccg ataaacacaa tgaattcctc 4380
aaggaacttg ggctgccgct gctaccctac ggttctgagg tatcacggtg agaaacgcct 4440
atggcaattt ggttgtccc tgtgagctcg cacggcgggt tcaaatccct attagaattt 4500
gaatccaata caccatcggt ccaccgcaa ataatatcgc ggaatatcag taaataattc 4560
tccgcacttt ttacgttcga gcagcgccac aacgtaccgg tcggcgtttg ttacgggctt 4620
gaggtcaaag catcgcatag gctttcgacc tcggtggaag ctt 4663

```

【図面の簡単な説明】

- 【図1】 試料細菌DNAの配置を示す図である。
- 【図2】 PA-2-31プローブを用いたドットプロット・ハイブリダイゼーションの結果を示す図である。
- 【図3】 PA-3-12プローブを用いたドットプロット・ハイブリダイゼーションの結果を示す図である。
- 【図4】 PA-4-15プローブを用いたドットプロット・ハイブリダイゼーションの結果を示す図である。
- 【図5】 PA-13-3プローブを用いたドットプロット・ハイブリダイゼーションの結果を示す図である。
- 【図6】 PA-2-31およびPA-13-3による混合プローブを用いたシュードモナス・アエルギノーズ菌の検出系での光学顕微鏡(×1,000)による発色シグナル(矢印)を示す図である。
- 【図7】 (a)~(f)は、それぞれ、様々な白血球細胞密度で固定した試料の外観を示す図である。
- 【図8】 (a) *S. aureus*と*S. epidermidis*に対する溶菌酵素の経時的活性、(b) *P. aeruginosa*と*E. coli*に対するアルカリ剤に対する活性、および(c) *E. faecalis*に対する溶菌酵素の経時的活性を示すグラフである。
- 【図9】 (a) N-アセチルムラミダーゼ 300単位/ml、(b) リゾチーム10,000単位/ml、および(c) リゾスタフィン50単位/mlに対するDMSOの濃度依存的効果を示すグラフである。

【図10】 (a) プロテアーゼ 0.2単位/mlのみ、(b) PMSF 1 μ mol/ml、(c) PMSF 10 μ mol/ml、(d) PMSF 0.1mmol/ml、および(e) PMSF 1mmol/mlに対するPMSFの添加効果を示す図である。

【図11】 (a)~(e)は、それぞれ、本発明に従って調製した食食サンプルが、細菌が食細胞によって食食されて形態変化を起こしていることを指し示す図である。

【図12】 (a) 酵素処理前の*S. aureus*の食食サンプル、(b) 処理前の*E. faecalis*の食食サンプル、(c) (a)を酵素処理して得た後のサンプル、および(d)は(b)を酵素処理して得た後の食食サンプルに対する酵素処理の効果を示す図である。

【図13】 In situハイブリダイゼーションでのる至適プローブ濃度を調べるために用いた食食サンプル塗抹用スライドガラスの概観を示す図である。

【図14】 In situハイブリダイゼーションでのる至適温度を調べるために用いた食食サンプル塗抹用スライドガラスの概観を示す図である。

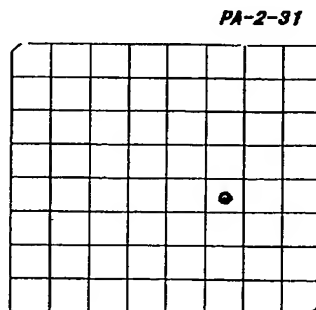
【図15】 (a)および(b)は、in situハイブリダイゼーション系でのSDS添加効果を示す図である。

【図16】 (a) は、ジゴキシゲニンラベル化PAプローブPA-13-3の鎖長と標識によるシグナル強度を示すサザンプロットの結果を示すであり、(b) は、電気泳動の結果を示す図である。

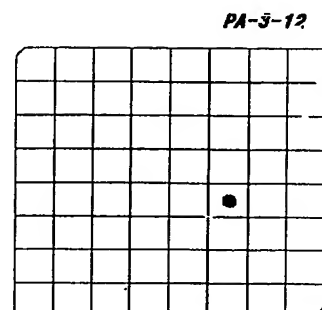
【図1】

1	2	3	4	5	6	7	8
9	10	11	12	13	14	15	16
17	18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	31	32
33	34	35	36	37	38	39	40
41	42	43	44	45	46	47	48
49	50	51	52	53	54	55	56
57	58	59	60	61	62	63	64

【図2】

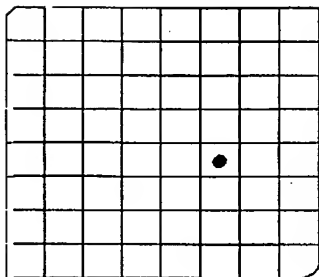


【図3】



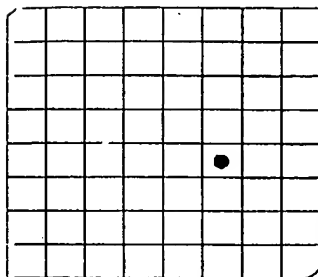
【図4】

PA-4-15

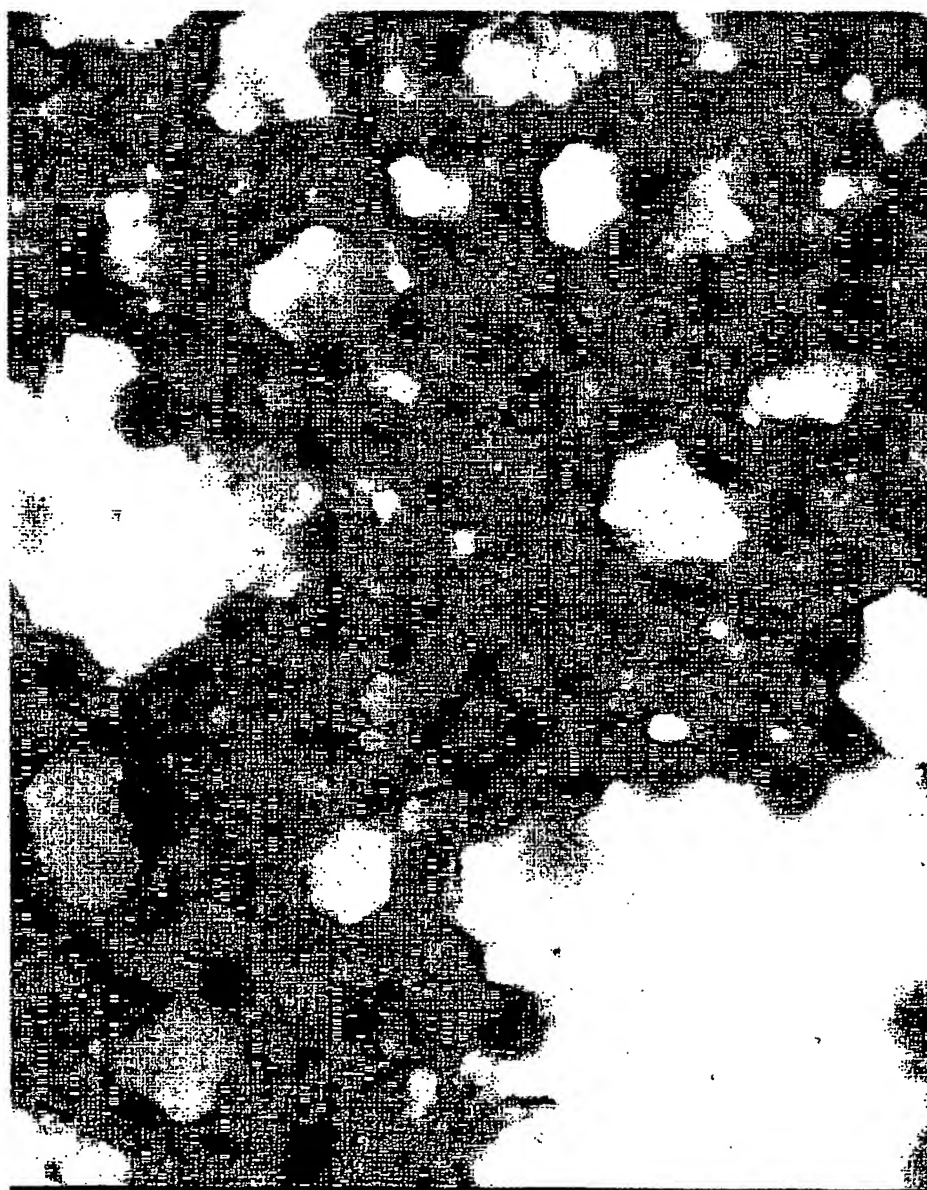


【図5】

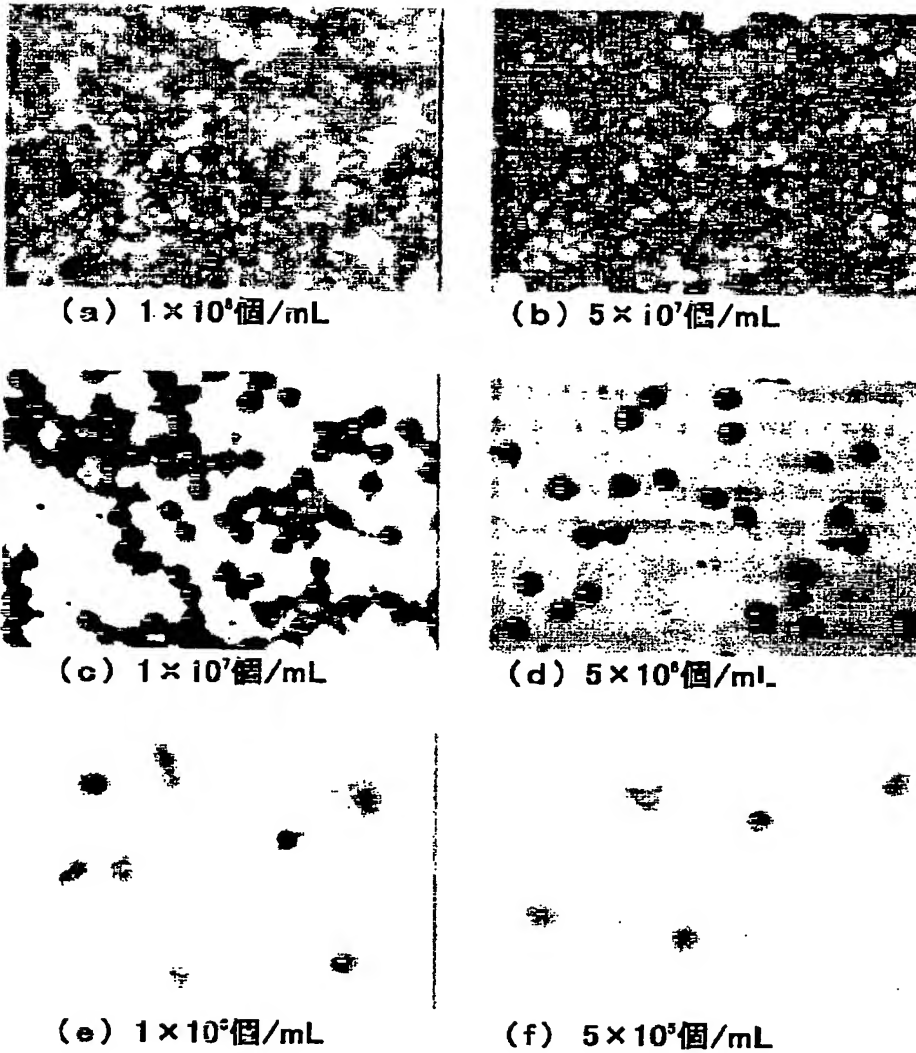
PA-13-3



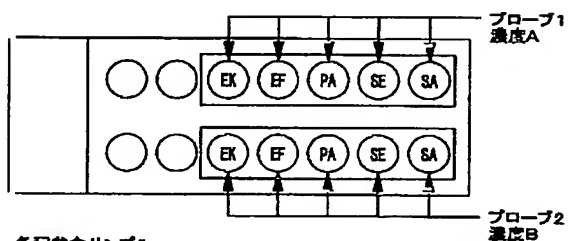
【図6】



【図7】



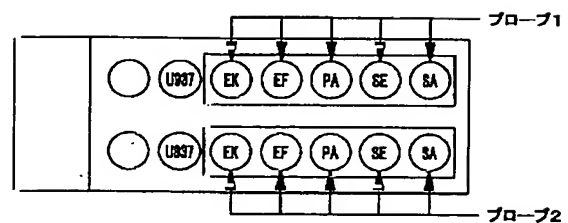
【図13】



各種貧食サンプル

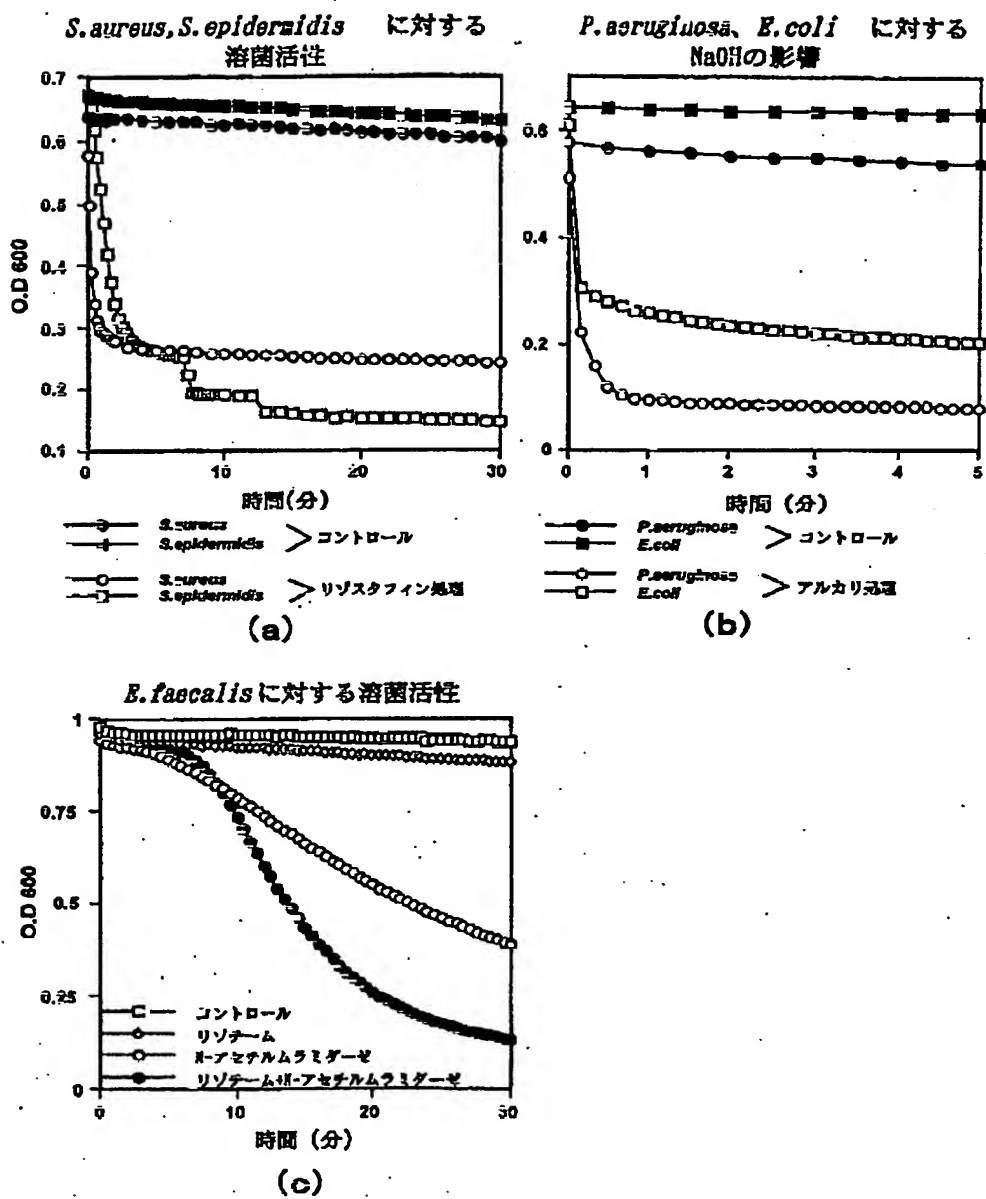
SA : SA貧食サンプル
SE : SE貧食サンプル
PA : PA貧食サンプル
EF : EF貧食サンプル
EK : EK貧食サンプル

【図14】

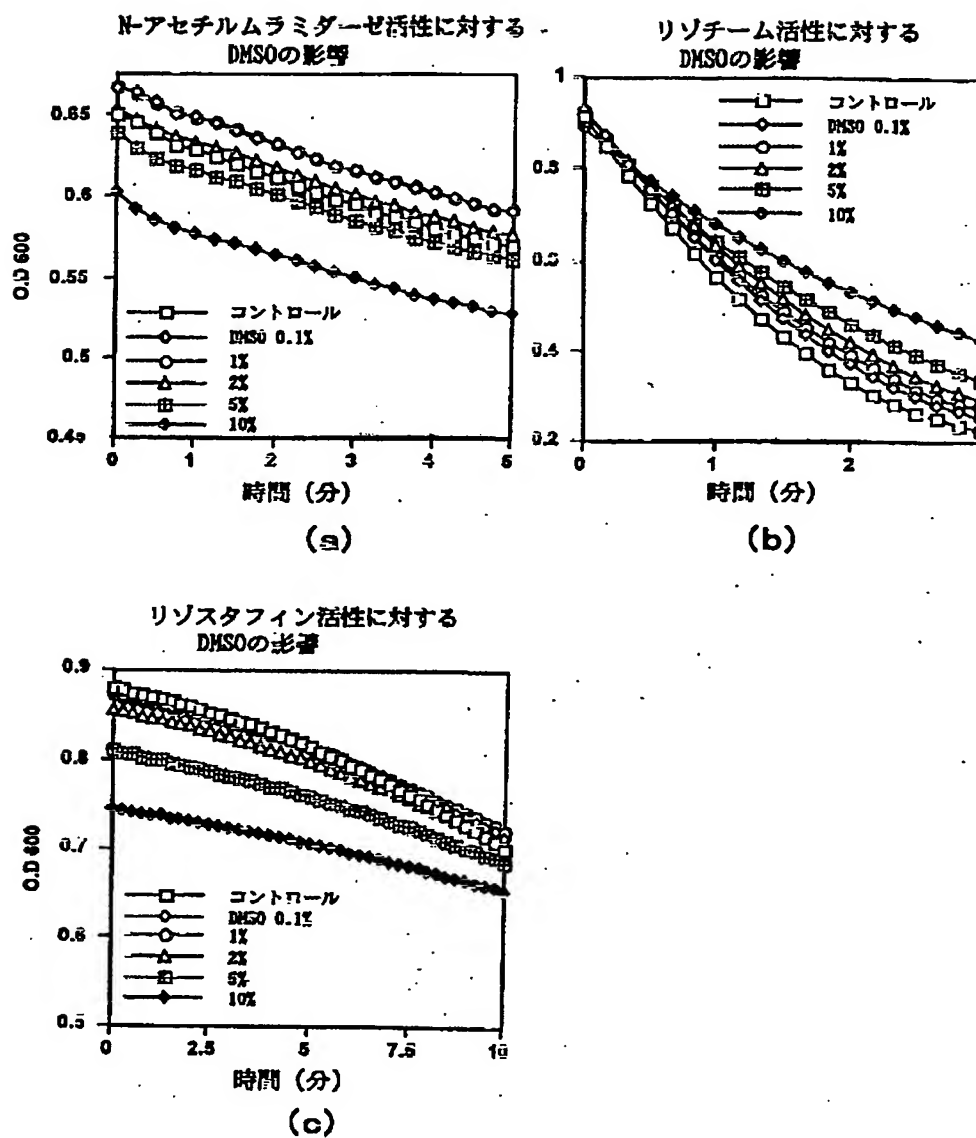


SA : SA貧食サンプル
SE : SE貧食サンプル
PA : PA貧食サンプル
EF : EF貧食サンプル
EK : EK貧食サンプル

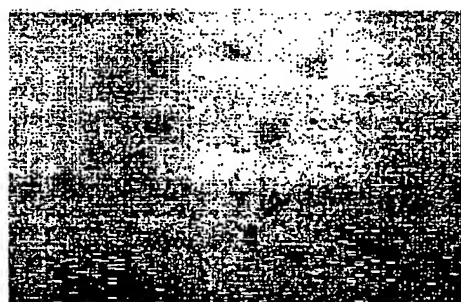
【図8】



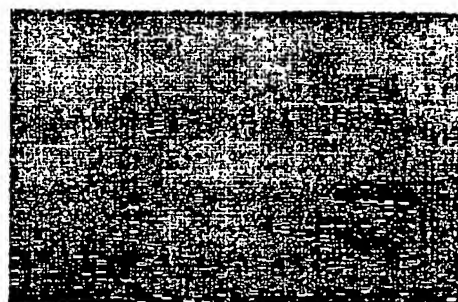
【図9】



【図10】



(a)



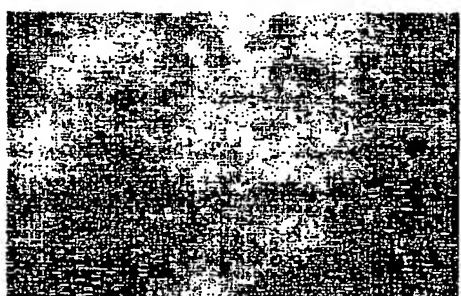
(b) PMSF 1 μ mol/mL



(c) PMSF 10 μ mol/mL

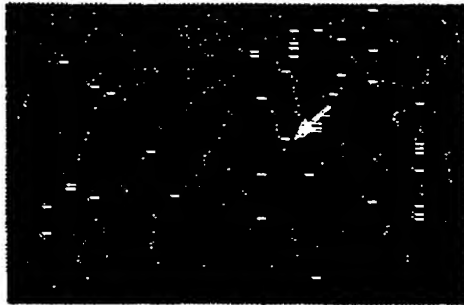


(d) PMSF 0.1nmol/mL

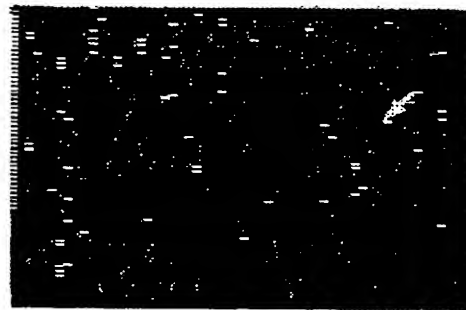


(e) PMSF 1mmol/mL

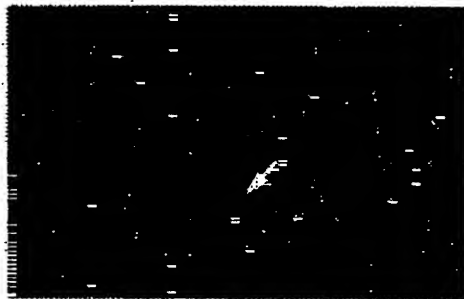
【図11】



(a) SA貧食サンプル



(b) SE貧食サンプル



(c) PA貧食サンプル



(d) EF貧食サンプル



(e) EK貧食サンプル

写真中の矢印は
貧食された細菌を示す

【図12】



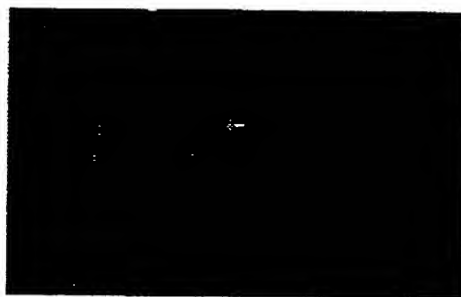
(a) SA処理前



(b) EF処理前

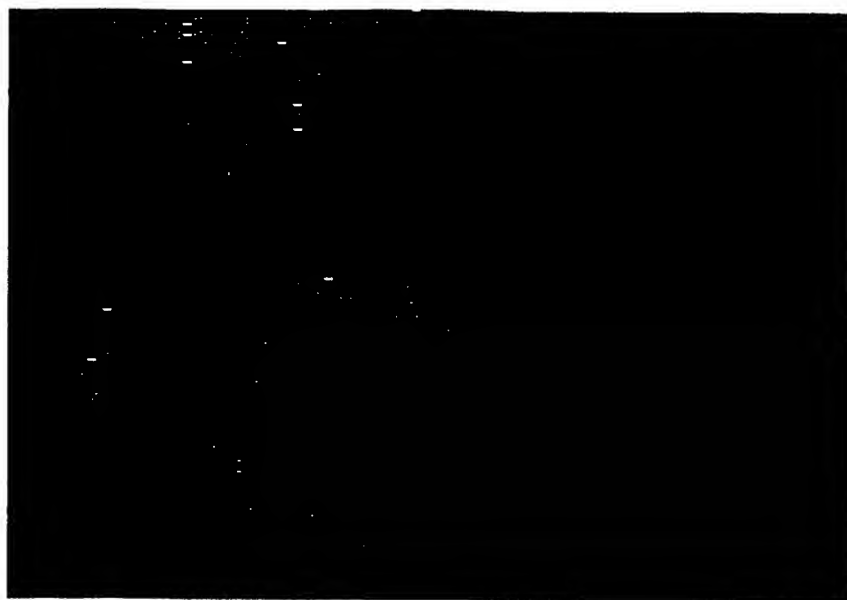


(c) SA処理後

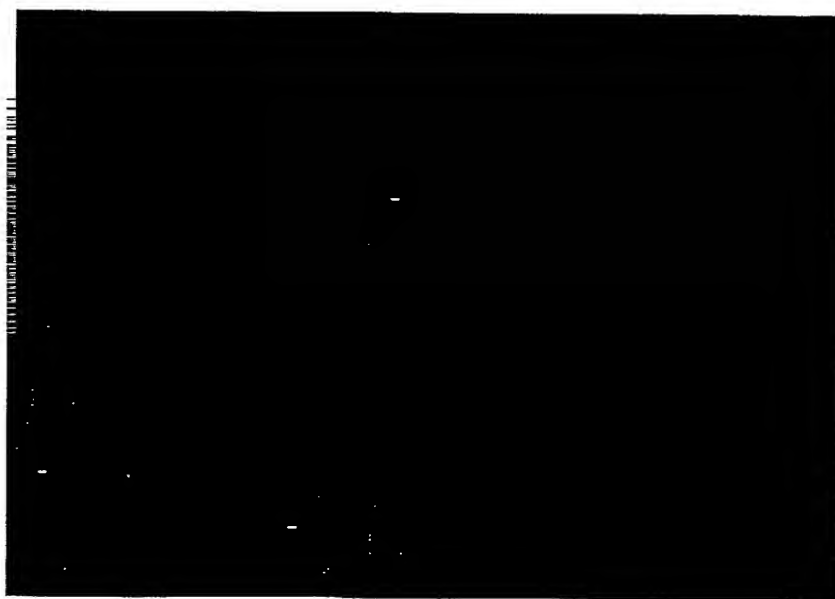


(d) EF処理後

【図15】

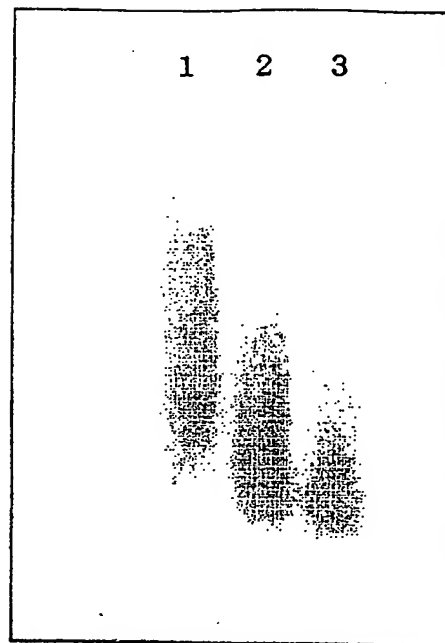


(a)



(b)

【図16】



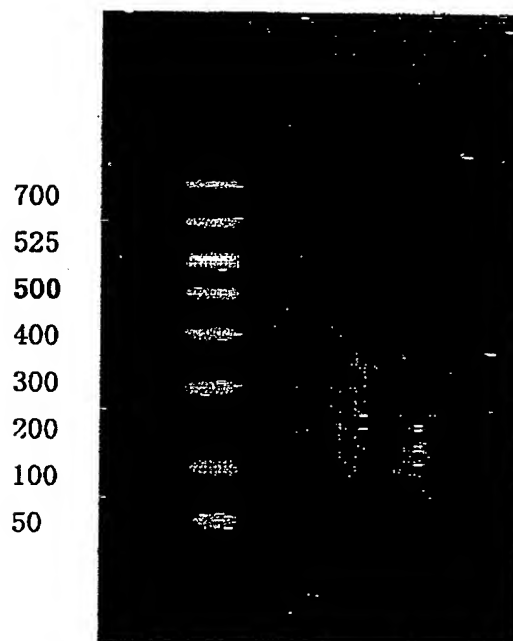
DNase 量

1. 20mU

2. 40mU

3. 60mU

(a)



(b)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

C 1 2 Q 1/34

1/68

G 0 1 N 33/53

識別記号

F I

G 0 1 N 33/53

33/566

33/569

(参考)

M

D

33/566
33/569
//(C12Q 1/04
C12R 1:385)

C12R 1:385
C12N 15/00 ZNAA
F

(72)発明者 杉本 典彦
大阪府八尾市美園町4-115-1-403
(72)発明者 川口 直子
大阪府高槻市真上町1-3-5-303
(72)発明者 芥子 亜矢
大阪府大阪市住吉区殿辻1-4-14-601
(72)発明者 岩見 高尚
大阪府貝塚市久保130-21

(72)発明者 上原 啓嗣
兵庫県宝塚市長尾町8-13-412
Fターム(参考) 4B024 AA11 CA03 HA14
4B029 AA07 BB20 CC03 FA15
4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ06 QQ08
QR13 QR32 QR48 QR51 QR56
QR82 QS22 QS33 QS34 QS36
QX01

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)